

Isotopenstudien zum  
Problem der Kohlensäureassimilation  
durch grüne Pflanzen

von

HEINZ KAUSS

1961



Isotopenstudien zum Problem der  
Kohlensäureassimilation durch grüne Pflanzen.

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
zu München.

vorgelegt  
von  
Heinz Kauß  
aus  
Ungstein/Pfalz

---

Juli 1961



Berichterstatter:

Prof. Dr. O. Kandler

Prof. Dr. L. Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1961.

# Inhalt

=====

|                                                                                                                                                                   | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung .....                                                                                                                                               | 3     |
| II. Material und Methoden .....                                                                                                                                   | 5     |
| 1. Anzucht und Vorbereitung der Algen .....                                                                                                                       | 5     |
| 2. Ausführung der CO <sub>2</sub> -Fixierungsversuche .....                                                                                                       | 6     |
| 3. Analyse der radioaktiven Fixierungsprodukte .....                                                                                                              | 7     |
| 4. Messung der Radioaktivität .....                                                                                                                               | 8     |
| 5. Abbau radioaktiv markierter Glucose .....                                                                                                                      | 9     |
| III. Ergebnisse .....                                                                                                                                             | 9     |
| <u>Teil A.</u> Identifizierung einiger unbekannter radioaktiver<br>Substanzen und Aufklärung ihrer Beziehungen zu<br>Zwischenstoffen der Photosynthese .....      | 9     |
| 1. Das Ribuloseoxim .....                                                                                                                                         | 9     |
| 2. Der spontane Zerfall der Ribulose .....                                                                                                                        | 13    |
| 3. Das 1-2-cyclische Glucosemonophosphat .....                                                                                                                    | 15    |
| <u>Teil B.</u> CO <sub>2</sub> -Assimilation und Glucosestoffwechsel bei<br>Ochromonas malhamensis und deren Beeinflussung<br>durch definierte Avitaminosen ..... | 18    |
| 1. Auswahl geeigneter Anzuchtbedingungen .....                                                                                                                    | 18    |
| 2. Die CO <sub>2</sub> -Assimilation im Dunkeln .....                                                                                                             | 24    |
| 3. Die CO <sub>2</sub> -Fixierung im Licht .....                                                                                                                  | 29    |
| 4. Der Einfluß von Glucosefütterung auf die<br>Photosynthese .....                                                                                                | 34    |
| 5. Der Einfluß von Thiaminmangel auf die CO <sub>2</sub> -<br>Assimilation im Dunkeln .....                                                                       | 37    |
| 6. Die Photosynthese thiaminverarmter Ochromonas-<br>zellen .....                                                                                                 | 41    |
| 7. Der Einfluß von Biotinmangel auf die Dunkel-<br>fixierung von CO <sub>2</sub> .....                                                                            | 45    |
| 8. Der Einfluß von Biotinverarmung auf die<br>Photosynthese .....                                                                                                 | 50    |
| 9. Der Einfluß von B <sub>12</sub> -Mangel auf die CO <sub>2</sub> -<br>Fixierung im Dunkeln und im Licht .....                                                   | 54    |
| 10. Der Glucosestoffwechsel bei Biotinmangel .....                                                                                                                | 54    |
| a) Dunkelversuche .....                                                                                                                                           | 54    |
| b) Lichtversuche .....                                                                                                                                            | 57    |
| IV. Diskussion der Ergebnisse .....                                                                                                                               | 59    |
| V. Zusammenfassung .....                                                                                                                                          | 63    |
| VI. Literaturverzeichnis .....                                                                                                                                    | 65    |

Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## I. Einleitung:

Die grünen Pflanzen können die Strahlungsenergie des Lichtes in chemisch verwertbare Energie umwandeln und durch den Aufbau von organischen Verbindungen aus Kohlendioxyd und Wasser speichern. Als primäre Speicherstoffe konnte man schon frühzeitig Oligo- und Polysaccharide nachweisen, die sich vor allem von der Glucose und Fructose ableiten. Die Frage nach dem Syntheseweg dieser Zucker ließ sich lange Zeit allerdings nur durch Spekulationen und Modellversuche angehen. Erst durch die Einführung der Isotopentechnik in die Photosyntheseforschung durch Ruben (1939) eröffnete sich ein direkter experimenteller Zugang zu diesem Problem. Als nach 1945 größere Mengen des radioaktiven Isotopes  $C^{14}$  zur Verfügung standen und mit der Papierchromatografie eine epochemachende neue analytische Methode eingeführt wurde, konnten die Arbeiten in breiter Front vorangetrieben werden. Einen gewissen vorläufigen und erfolgreichen Abschluß erreichten sie mit der Aufstellung des inzwischen als lehrbuchreif erachteten "Photosynthesecyclus" durch den Arbeitskreis um Calvin (Bassham et al. 1954, Bassham und Calvin 1957). Danach erfolgt die primäre  $CO_2$ -Fixierung durch Carboxylierung des Ribulose-1-5-diphosphats zu einem labilen Zwischenprodukt (nach Moses und Calvin 1957 ein 2-carboxy-3-ketopentitol-1-5-diphosphat), welches zu zwei Molekülen 3-Phosphoglyzerinsäure zerfällt. Diese soll in Umkehrung der Glycolyse zu Triosephosphaten reduziert und durch die Aldolasereaktion in Fructose-diphosphat umgewandelt werden. Das Fructosediphosphat wird in einem Cyclus durch Kombination von Transaldolase- und Transketolasereaktionen in das Ribulosediphosphat zurückverwandelt.

Obwohl diese Konzeption von Calvin in ihren Grundzügen gesichert ist, wurden doch bald eine Reihe von experimentellen Befunden bekannt, die einzelne Teilschritte des "Photosynthesecyclus" zweifelhaft erscheinen lassen.

Die Vorstellungen Calvins verlangen eine stöchiometrische Beziehung zwischen dem Umsatz des energiereichen Phosphats und der  $CO_2$ -Assimilation. Versuche über die Änderung des Phosphatspiegels bei Belichtung von Chlorella sollen nach Kandler (1957) zeigen, daß dieses nicht zutrifft. Da die Hexose aus zwei vollkommen gleichwertigen Triosephosphaten aufgebaut wird, wäre zu erwarten, daß ihre obere und untere Hälfte sich in der Verteilung von assimiliertem  $C^{14}O_2$  spiegelbildlich gleich sind. In den von Gibbs und Kandler (1957) und Kandler und Gibbs (1956, 1959) veröffentlichten Abbauversuchen wurde dagegen eine asymmetrische Verteilung festgestellt. Auch Versuche von Kandler et al. (1961) und Mortimer (1958), in denen mit

Stoffwechselgiften von bekannter Wirkweise die  $\text{CO}_2$ -Assimilation an bestimmten Stellen gehemmt wurde, brachten nicht die nach dem Calvinschen Schema zu erwartenden Ergebnisse.

Auf der Grundlage dieser experimentellen Feststellungen entwickelte Kandler (1957, 1961) eine Vorstellung, nach der der Reduktionsschritt bei der Photosynthese durch ein noch unbekanntes Enzym direkt an der durch Addition des  $\text{CO}_2$  an das Ribulosediphosphat entstandenen Ketosäure stattfindet. Der dabei resultierende verzweigte Zucker könnte dann unter Umgehung der Triosephosphatdehydrogenase zu Fructosediphosphat isomerisiert werden. Inzwischen ist der Arbeitskreis um Calvin durch eine neue Auslegung seiner Versuchsdaten zu dem Ergebnis gekommen (Calvin und Pon 1959, Calvin 1960, Bassham und Kirk 1960), daß bei dem Zerfall des labilen Primärprodukts nicht 2 Moleküle Phosphoglyzerinsäure, sondern 1 Molekül Triosephosphat und 1 Molekül Phosphoglyzerinsäure entstehen. Dies stellt einen Kompromiss zwischen der ursprünglichen Auffassung und der Vorstellung Kandlers dar, da hierbei ebenfalls eine zumindest teilweise Reduktion der Ketosäure vorausgesetzt wird.

Weitere Zweifel an der Vollständigkeit des Calvinschen Schemas gingen von dem Befund aus (Metzner et al. 1957 a, b; 1958. Metzner 1958), daß bei der üblichen Abtötung der Versuchsobjekte in heißem Alkohol ein Teil der fixierten Radioaktivität verloren geht. Da man durch Zugabe von Hydroxylamin eine erhöhte Fixierungsrate erreichen kann, schlossen Metzner et al., daß dadurch ein sonst instabiler Aldehyd abgefangen und stabilisiert werden könne.

Einen Ansatzpunkt der Kritik stellen auch die Eigenschaften des Enzyms dar, welches die Carboxylierung des Ribulosediphosphates bewirkt. Diese sogenannte Carboxydismutase hat in vitro eine extrem geringe Umsatzzahl und eine sehr geringe Affinität zu  $\text{CO}_2$  (Racker 1957). Das gesamte Eiweiß der Zelle müßte als Carboxydismutase fungieren, wenn man mit der Aktivität der besten Präparate auch nur einen Bruchteil der in vivo gemessenen  $\text{CO}_2$ -Fixierung von Chlorella erklären will (Berechnung von Holm-Hansen et al. 1959). Da in der Zelle noch sehr viele andere Enzyme vorhanden sind, kann aber ein einziges Ferment höchstens einige Prozent des Gesamtproteins ausmachen. Man muß daraus folgern, daß die Carboxydismutase in der lebenden Pflanze noch durch andere Enzyme unterstützt wird, die entweder das  $\text{CO}_2$  aktivieren oder für eine schnelle Beseitigung des Reaktionsproduktes "Ketosäure" sorgen. Interesse verdient weiterhin noch die Beobachtung von Richter (1959), der bei der strikt photoautotrophen Blaualge *Anacystis nidulans* keine Aldolase finden konnte, obwohl bei ihr die  $\text{CO}_2$ -Fixierung

zu den gleichen Produkten wie bei den anderen grünen Pflanzen führt (O.Kandler, unveröffentlicht).

Die hier kurz dargestellten Einwände gegen die derzeitigen Anschauungen über den Weg des Kohlenstoffs bei der Photosynthese ermutigten zu weiteren Isotopenstudien zu diesem Problem. In Teil A dieser Arbeit werden Versuche beschrieben, die die Identifizierung verschiedener bisher unbekannter radioaktiver Substanzen und deren Einordnung in das Stoffwechselgeschehen ermöglichten. Im Teil B wird der Einfluß von Avitaminosen auf die  $\text{CO}_2$ -Assimilation im Licht und in der Dunkelheit abgehandelt. Dazu mußte auch die allgemeine Stoffwechselphysiologie des verwendeten vitaminheterotrophen Flagellaten *Ochromonas malhamensis* näher untersucht werden.

## II. Material und Methoden:

### 1.) Anzucht und Vorbereitung der Algen.

Als Versuchsobjekt diente in Teil A der gleiche Stamm der Grünalge *Chlorella pyrenoidosa*, den auch Kandler (1957) benutzte. Diese Alge wurde in Reinkultur auf Agarschrägröhrchen (2-fache Salzmenge, aber ohne Fe und ohne Trilon, mit 1,8 % Agar) gehalten und für die Versuche bei Zimmertemperatur in 1 Liter-Waschflaschen herangezogen, die mit einer ungefähr 4 %  $\text{CO}_2$ -Luftmischung durchperlt wurden. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 1 Liter  $\text{H}_2\text{O}$  dest. + 0.4 g  $\text{KNO}_3$  + 0.1 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  + 0.1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 0.1 g  $\text{KCl}$  + 0.1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 2 mg  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  + 0.3 ml Hoaglandsche Lösung A-Z + 10 ml gesättigte Lösung von Trilon B Säureform. Als Lichtquelle dienten 2 Tageslicht-Leuchtstoffröhren 40 Watt in 30 cm Entfernung auf jeder Seite.

Für Teil B wurde ein Stamm von *Ochromonas malhamensis* Pringsheim (Algensammlung des pflanzenphysiol. Inst. Göttingen 933-1) verwendet, den uns Herr Prof. Pringsheim freundlicherweise überließ. Größere Mengen wurden unter sterilen Bedingungen in 1 Liter-Fernbachkolben mit 500 - 600 ml Beschickung herangezogen. Jeden 2. Tag wurden diese Kolben mit einer 5 %  $\text{CO}_2$ /Luftmischung durch ein Wattefilter mit Hilfe einer langen Injektionsnadel begast. Als Lichtquelle dienten 3 Tageslichtleuchtstoffröhren 40 Watt, die auf der Unterseite eines Tisches in 60 cm Entfernung vom Boden montiert waren. Das Kulturmedium (pH 5.5) für die endgültigen Versuche enthielt nach Hutner et al. (1953) folgende Substanzen: 1 Liter  $\text{H}_2\text{O}$  dest. + 1 g L-Glutaminsäure + 3 g Na-H-Glutamat + 0.8 g  $\text{NH}_4$ -H-Citrat + 0.4 g dL-Methionin + 0.5 g L-Histidin-HCl + 0.5 g L-Arginin-HCl + 20 mg Cystin

+ 3 g Glucose + 0.15 g  $\text{CaCO}_3$  + 0.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 2 mg Thiamin-HCl + 4  $\gamma$  Vitamin  $\text{B}_{12}$  Merck + 5  $\gamma$  Biotin + 2.5 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 10 ml Spurenelementlösung nach Hutner. Für die Versuche mit Vitaminverarmung wurde die entsprechende Menge Algen steril zentrifugiert, dreimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in ein Medium geimpft, dem der fragliche Faktor fehlte.

Chlorella wurde am 3. bis 4., Ochromonas am 5. Tage nach dem Animpfen durch Zentrifugieren geerntet und 2 mal mit Wasser (oder NaCl-Lösung) gewaschen. Die Algen wurden dann in destilliertem Wasser oder zum Nährboden isotonischer Kochsalzlösung (2.35 g/l) suspendiert. Um bei den Fixierungsversuchen gleiche Belichtungsverhältnisse zu gewährleisten, wurde immer die gleiche optische Dichte eingestellt (1:50 verdünnt, 1 cm Schichtdicke, Chlorella  $D=1.0$ , Ochromonas  $D=0.8$  bei 510 m $\mu$ ). Sodann wurden Portionen zur Bestimmung von Trockengewicht, fettfreier Trockenmasse, Stickstoff und Chlorophyll entnommen. Das Trockengewicht wurde direkt in den Veraschungskölbchen ermittelt, die zur Bestimmung des Stickstoffes nach der üblichen Microkjeldahlmethode dienen. Chlorophyll wurde spektrophotometrisch nach den Angaben von Arnon (1949) bestimmt. Der dabei nach 2-maliger Extraktion mit heißem Methanol gewonnene Rückstand ergibt einen Wert für das Gewicht der "fettfreien Trockenmasse". Dabei ist zu beachten, daß die Extraktion möglichst wasserfrei geschieht, da sich sonst das später besprochene Polysaccharid aus Ochromonas löst, beim Verdünnen des Chlorophylls wieder ausfällt und so ungenaue Messwerte verursacht. Der pH-Wert der Algensuspension wurde mit verdünnter HCl oder NaOH auf 5.2 - 5.3 eingestellt.

Die Atmungsgröße wurde nach der direkten Methode nach Warburg bestimmt (Umbreit et al. 1959). Sollte dabei die Radioaktivität des aus markierter Glucose ausgeschiedenen  $\text{CO}_2$  zum Feststellen des  $\text{C}_1/\text{C}_6$ -Verhältnisses bestimmt werden, so enthielt der Mitteleinsatz 0.4 ml 0.5 % KOH, welche nach dem Versuch in aliquoten Teilen auf Kupferplättchen ausgestrichen und sofort gezählt wurde.

## 2.) Ausführung der $\text{CO}_2$ -Fixierungsversuche.

Die Fixierungsversuche wurden mit 2 oder 3 ml dieser Suspension in einem sogenannten "lollipop" vorgenommen. Es ist dies eine runde Auslaufküvette mit 35 cm Durchmesser und 0.5 cm Schichtdicke, durch deren Kühlmantel aus einem Thermostaten Wasser gepumpt werden kann. Die Temperatur des Kühlwassers betrug bei Versuchen mit Chlorella 18°C und mit Ochromonas 24°C. Die Küvette wurde von 2 Seiten aus 75 cm Entfernung mit je einer Nitraphot-Lampe 500 Watt (ungefähr 20 000 Lux) bestrahlt. Bei Dunkelversuchen war

der "lollipop" mit einer schwarzen PVC-Folie umhüllt. Vor jeder Fixierung wurden die Algen in der Küvette zur Erreichung eines stationären Zustandes 5 Minuten unter Durchleiten von 0.5 %  $\text{CO}_2$ /Luft belichtet. Sollte die Fixierungsrate exakt bestimmt werden so wurde 1 Minute lang mit gereinigtem  $\text{N}_2$  das gelöste  $\text{C}^{12}\text{O}_2$  ausgetrieben, um eine Verdünnung des  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  zu vermeiden. Danach wurde mit einer Rekordspritze eine 1/100 molare  $\text{KHC}^{14}\text{O}_3$ -Lösung (24.0 mC/mM) eingespritzt. Die Menge richtet sich nach der Fixierungsdauer und betrug für 1 Minute 0.15 ml. Nach Ablauf der jeweils gewünschten Assimilationszeit wurden die Algen in heißen Alkohol (Endkonzentration 80 %) einlaufen gelassen, durch kurzes Aufkochen extrahiert und aliquote Teile zum Bestimmen der aufgenommenen Radioaktivität auf dünne Aluminiumplättchen in "unendlich dünner Schicht" aufgetrocknet.

### 3.) Analyse der radioaktiven Fixierungsprodukte.

Zur weiteren Aufarbeitung wurde vom Alkohol abzentrifugiert, der Rückstand zweimal mit 20 % Alkohol gewaschen und seine Radioaktivität wie oben bestimmt. War diese hoch genug, so wurden die darin enthaltenen Polysaccharide mit 1 n HCl 90 Minuten hydrolysiert und nach Abdampfen der HCl chromatografiert. Die Hydrolyse erübrigte sich bei kurzen Fixierungszeiten und bei Versuchen mit *Ochromonas*. Die gesamten Extrakte wurden zusammen in einem Büchli - Vakuumrotationsverdampfer eingengt, die Radioaktivität des Konzentrates bestimmt und danach papierchromatografisch analysiert (Wathman Nr.1, gewaschen mit n/10 Oxalsäure). Ein kleiner Teil wurde zweidimensional in wassergesättigtem Phenol und Butanol/Propionsäure/ $\text{H}_2\text{O}$  (Mischung 1:1 von Butanol: $\text{H}_2\text{O}$  = 75:5 und Propionsäure: $\text{H}_2\text{O}$  = 352:448), der größte Teil in Streifen eindimensional mit dem Butanolgemisch getrennt. Die Chromatogramme wurden zur Autoradiografie solange auf AGFA-Röntgenpapier belassen, bis Flecken mit 0.5 - 1 % der Gesamtaktivität eine deutlich sichtbare Schwärzung ergaben. Als Faustregel gilt, daß Flecken mit 100 Impulsen/Min. nach ungefähr drei Wochen Exposition gut sichtbar sind. Nach dem Entwickeln der Röntgenpapiere wurden die Flecken vor einem Leuchtkasten durchgezeichnet und ihre Radioaktivität gemessen.

Da die Phosphatester sich bei dieser Chromatografiemethode im wesentlichen nur in Diphosphate, Monophosphate und Phosphoglyzerinsäure auftrennen lassen, wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und dephosphoryliert. Dazu wurden die Papierstreifen mit einer Lösung von "Polydase S" (Schwarz Bio Research Inc. Mount Vernon N.Y., vor Gebrauch 2 Tage gegen Wasser dialysiert) in m/50 Acetatpuffer pH 5.2 befeuchtet und 36 h in eine feuchte Kammer gehängt. Die durch das Dephosphorylieren erhaltenen

freien Zucker wurden mit Wasser eluiert, die Lösung in einer Gefrier-trocknungsanlage konzentriert und erneut zweidimensional in den oben beschriebenen Lösungsmitteln chromatografiert.

Die radioaktiven Flecken wurden durch "Cochromatografie" mit in Frage kommenden chemisch reinen Substanzen identifiziert. Als zusätzliche Lösungsmittel dienten dabei für Aminosäuren und Zucker Isopropanol/Eisessig/Wasser (7:1:2) und Picolin/Ammoniak/Wasser (70:2:28), für Säuren Propanol/Ammoniak (7:3). Gesprüht wurden Aminosäuren mit Ninhydrin, Zucker mit Anilin/Trichloressigsäure und Säuren mit Glucose/Anilin/Butanol (alles nach Linskens 1959). Glyzerinsäure wurde mit dem Reagenz nach Trevelyan et al. (1950) nachgewiesen. Die benötigten Substanzen wurden von den Firmen Merck, Schuchardt, Riedel de Haen und der California Corporation bezogen. Radioaktive Stoffe vermittelte das Isotopenlaboratorium Karlsruhe. Ribuloseoxim wurde nach der Vorschrift von Wohl (1893) aus Ribulose hergestellt. Sofern besondere Methoden zur Identifizierung notwendig waren, sind sie bei den Ergebnissen vermerkt.

Zur Elektrophorese bei der Identifizierung von Flecken diente ein Elphor I-Gerät der Firma Bender u. Hobein. Im allgemeinen wurde mit n/10 Propionsäure/NaOH-Puffer pH 9.0 oder pH 5.5 gearbeitet. Zur Trennung von Nucleosiden wurde Boratpuffer nach Jaenicke (1952) verwendet. Zur Unterscheidung von Mono- und Dicarbonsäuren reichten 5 h und zur Co-Elektrophorese von Nucleosiden 15 h bei 300 V/0.7 mA. Die fragliche Substanz wurde auf Wathman Nr. 1-Papier aufgetragen und feucht zwischen 2 Glasplatten gelegt. Zum Vergleich wurden radioaktive Flecken bekannter Substanzen (Glucose, Glyzerinsäure, Äpfelsäure) parallel mitlaufen gelassen.

#### 4.) Messung der Radioaktivität.

Zur Bestimmung der Radioaktivität stand ein Strahlenmessgerät der Firma Frieske u. Höpfner FH 49 und FH 51 und ein Zählgerät des Laboratoriums Prof. Berthold (Wildbad/Schw.) zur Verfügung. Chromatogramme wurden mit großflächigen Methandurchflußzählrohren ausgezählt, die als Endfenster eine sehr dünne Kunststoffolie besitzen. Alle auf Plättchen ausgeschmieren Substanzen wurden im  $2\pi$ -Methandurchflußzählrohr des FH 51 gemessen.

Sollte die Radioaktivität besonders exakt bestimmt werden, so wurde die Substanz entweder durch Oxydation im Bombenrohr oder durch Decarboxylierung in  $\text{CO}_2$  überführt und dessen Aktivität in Gaszählrohren gemessen. Es diente dazu eine Anordnung nach Simon et al. (1959), an der ein birnenförmiger Ansatz am Hochvakuumrechen erlaubte, das  $\text{CO}_2$  aus Bariumcarbonat mit 85 % Phosphorsäure auszutreiben. Diese Zählmethode hat neben

der sehr viel größeren Genauigkeit noch den Vorteil, daß sie gleichzeitig durch volumetrische Gasmessung eine quantitative Bestimmung des Kohlenstoffs erlaubt. Damit ist es möglich, die spezifische Aktivität direkt in Millicurie pro Millimol anzugeben.

### 5.) Abbau radioaktiv markierter Glucose.

Die Glucoseabbauten wurden durch Vergären mit *Leuconostoc mesenteroides* ausgeführt. Dieses heterofermentative Milchsäurebakterium erzeugt aus  $C_1$  der Glucose  $CO_2$ , aus  $C_{2,3}$  Äthanol und aus  $C_{4,5,6}$  Milchsäure (Gunsalus und Gibbs 1952, Bernstein et al. 1955). Der Gäransatz enthielt in großen Warburggefäßen: radioaktive Glucose, 0.5 mM Trägerglucose, 1 ml 1 molarer Phosphatpuffer pH 5.6, 0.5 ml Phosphatgel (25.5 mg  $Ca_3(PO_4)_2$ /ml),  $N_2$ -Gaspase, 15 h alte *Leuconostoc*-Zellen, Gesamtvolumen 15 ml. Nach Beendigung der Gärung wurde durch den Kamin 4 n KOH zugegeben, um darin das  $CO_2$  abzufangen. Die *Leuconostoc*-Zellen wurden bei  $0^\circ C$  abzentrifugiert und aus dem alkalisch gemachten Überstand der Alkohol abdestilliert. Durch 1 h Erhitzen auf  $90^\circ C$  im Rückfluß mit 1 g Kaliumbichromat in 4 n  $H_2SO_4$  wurde das Äthanol zu Essigsäure oxydiert. In einer Mikrokolonne (Wiesenberger 1948) wurde diese einer zweifachen Wasserdampfdestillation unterworfen und dann ein Drittel davon mit Kaliumpersulfat (1 g + 2 ml einer 2 %  $AgNO_3$ -Lösung, 60 Minuten,  $70^\circ C$ ) naß verascht und das  $CO_2$  als  $BaCO_3$  abgefangen. Es ergibt dies die Aktivität von  $C_2 + C_3$  der Glucose. Decarboxylieren der restlichen zwei Drittel der Essigsäure durch einen Schmidt-Phares Abbau (Aronoff 1958) ergibt das  $CO_2$  aus dem  $C_3$  der Glucose. Der Wert für  $C_2$  lässt sich dann aus der Differenz  $(C_2 + C_3) - C_3$  leicht berechnen. Die Milchsäure wurde mit Äther aus  $1/2$  n schwefelsaurer Lösung 36 h extrahiert, titriert und das Na-Lactat zweimal zur Trockne eingedampft. Durch dessen Decarboxylierung (1 n  $H_2SO_4$ , 2 g Chromtrioxyd,  $70^\circ C$ , 30 Min.) gelangt man zu  $CO_2$  aus  $C_4$ . Die zurückbleibende Essigsäure wird abdestilliert und wie oben zu  $BaCO_3$  aufgearbeitet, welches die Werte für  $C_5 + C_6$  und  $C_5$  ergibt.

### III. Ergebnisse.

Teil A. Identifizierung einiger unbekannter radioaktiver Substanzen und Aufklärung ihrer Beziehungen zu Zwischenstoffen der Photosynthese.

#### 1. Das Ribuloseoxim.

Die in der Einleitung erwähnten Versuche von Metzner et al. wurden als Hinweis auf ein labiles unbekanntes Zwischenprodukt des Photosynthesecyclus

ausgelegt. Diese Verbindung sollte durch Zugabe von Hydroxylamin stabilisiert werden. Zunächst glaubte man, einen radioaktiven Fleck mit den spektralen Eigenschaften eines Pteridins dieser Verbindung zuordnen zu können (Fuller et al. 1958 a). Später erwies sich dieser Fleck als Chromatografieartefakt (Bassham et al. 1958, Fuller et al. 1958 b).

Da Hydroxylamin leicht mit Aldehyden reagiert, erschien es sinnvoll, eine neue Substanz unter den Zuckerphosphaten zu suchen. Zu diesem Zweck wurden Fixierungsversuche angestellt, bei denen entweder während der gesamten Fixierungsdauer oder nur beim Abtöten Hydroxylamin zugegen war. Tabelle 1 zeigt die Fixierungsraten einer solchen Versuchsserie. Die Fixierung ist bei Zugabe von Hydroxylamin vor allem bei geringer Konzentration erhöht. Der Effekt ist besonders ausgeprägt, wenn das Gift während der ganzen Fixierungsdauer einwirkt, während sich eine Zugabe zum Abtötungsalkohol nur geringfügig bemerkbar macht.

Nach dem Dephosphorylieren der Diphosphatbande eindimensionaler Chromatogramme aus Versuchen mit Hydroxylaminzusatz lassen sich 2 neue Substanzen abtrennen (Fleck Nr.6 und 8 in Abb.1). Die Verbindung Nr.8 ist nicht regelmäßig vorhanden. Da es sich immer um sehr geringe Aktivitäten handelt, konnte sie nicht näher identifiziert werden.

Fleck Nr.6 tritt auch bei kurzen Fixierungszeiten von 15 sec auf. Sein prozentualer Anteil an den gesamten Diphosphaten schwankt zwischen 4 und 20 Prozent. Dabei sind verschiedene Hydroxylaminkonzentrationen ohne Einfluß. Der Anteil der Substanz ist auch unabhängig davon, ob

|                                             |      | NH <sub>2</sub> OH.HCl - Zugabe |      |       |             |      |       |
|---------------------------------------------|------|---------------------------------|------|-------|-------------|------|-------|
|                                             |      | vor der Fixierung               |      |       | zum Alkohol |      |       |
| Konzentration                               | 0    | m/20                            | m/60 | m/180 | m/20        | m/60 | m/180 |
| Fixierung (10 <sup>6</sup><br>Impulse/Min.) | 2.50 | 2.88                            | 3.70 | 4.75  | 2.54        | 2.84 | 3.33  |

Tabelle 1. Fixierungsraten für 30 sec PS und verschiedene Hydroxylaminkonzentrationen (berechnet auf 3 ml Algen).

das Gift vor oder während der Fixierung oder zum Abtötungsalkohol gegeben wurde. Die Bildung der Substanz geschieht also nicht durch ein kumulatives Abfangen eines in kleinen Mengen entstehenden Zwischenproduktes während der Fixierung, sondern durch Reaktion von Hydroxylamin mit einem normalen Zwischenstoff. Die starke Schwankung des prozentualen Anteils tritt auch bei Parallelchromatogrammen auf, was wahrscheinlich



Abbildung 1. Diphosphatester nach 1 Min. PS und  $m/40$   $NH_2OH.HCl$  dephosphoryliert und erneut chromatografiert.  
(1 Ribulose, 2 Fructose, 3 Glucose + Sedoheptulose, 4 Glyzerinsäure, 5 Rest, 6 Ribuloseoxim, 7 1-2-cyclisches Glucosemonophosphat, 8 + 9 nicht identifiziert)

auf kleine unkontrollierbare Variationen bei der Chromatografie zurückzuführen ist.

Zur Identifizierung wurden verschiedene Eigenschaften des Flecks Nr.6 festgestellt. Er verhält sich bei der Papierelektrophorese in saurem und alkalischem Puffer wie eine neutrale Substanz, ist also keine Säure oder Base. Durch alkalische Hydrolyse ( $0.01$  n NaOH, 2 h,  $100^\circ C$ ) läßt er sich in eine Serie von neuen Flecken umwandeln, die bei entsprechender Behandlung auch aus Glucose, Fructose und Ribulose entstehen. Durch saure Hydrolyse ( $0.05$  n HCl, 2 h,  $100^\circ C$ ) werden keine leicht flüchtigen Bruchstücke ( $CO_2$ , Ameisensäure, Formaldehyd) abgespalten, da vorgelegte Natronlauge und Dimedonlösung keinerlei Radioaktivität aufwiesen. Beim Chromatografieren trennten sich aus diesem Hydrolysat eine Reihe von Verbindungen ab, wobei der Hauptteil der Radioaktivität die  $R_f$ -Werte einer Pentose zeigte. Durch Cochromatografie mit chemisch reinem Material wurde diese Pentose als Ribulose erkannt. Das Vorhandensein der anderen beobachteten Flecke erschwerte zunächst zwar den Überblick, läßt sich aber nachträglich aus den in III 2 beschriebenen Eigenschaften der Ribulose leicht erklären, da sie den in Abb.2 gezeigten Bruchstücken der Ribulose entsprechen.

Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß die fragliche Verbindung das Kohlenstoffgerüst der Ribulose hat und sich nur durch eine kohlenstofffreie Gruppe von dieser unterscheidet. Durch Cochromatografie konnte bewiesen werden, daß der Fleck Nr.6 mit dem Oxim der Ribulose identisch ist. Bei der Zugabe von Hydroxylamin zu Algensuspensionen wird also in einer leicht reversiblen Reaktion aus Ribulose-1-5-diphosphat das entsprechende Oxim gebildet. Aus der Tatsache, daß diese Reaktion leicht umkehrbar ist, erklärt sich einerseits die auf vielen Chromatogrammen (Abb.1) zwischen der Ribulose und ihrem Oxim auftretende Schliere und andererseits auch die starke Schwankung der gebildeten Oximmenge.



Ribulose-1-5-diphosphat + Hydroxylamin = R-1-5-DP-oxim + Wasser

Mit der Identifizierung des bei Hydroxylaminversuchen auftretenden neuen Flecks als Oxim des Ribulosediphosphats ist die Wahrscheinlichkeit, aus solchen Versuchen wesentliche neue Erkenntnisse über den Photosynthesemechanismus zu erlangen, erneut gesunken. In der Einleitung wurde erwähnt, daß Metzner et al. die gegen heißes Äthanol instabile Fixierung und die bei Hydroxylaminzusatz meßbare Vergrößerung des  $\text{CO}_2$ -Einbaus verglichen und auf eine gemeinsame Ursache zurückgeführt haben. Dieser Schluß ist nicht ohne weiteres erlaubt. Bassham et al. (1958) führen die Steigerung bei Hydroxylaminzusatz auf die Veränderung des pH-Wertes durch das saure Hydroxylaminhydrochlorid zurück. Sie konnten den gleichen Effekt auch durch Zugabe von HCl erreichen. Somit dürfte die Assimilationssteigerung auf einer Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks in der Algensuspension beruhen. Die Beobachtung, daß geringere Konzentrationen von Hydroxylaminhydrochlorid die Fixierung bedeutend stärker erhöhen als hohe, läßt sich aus dieser Erklärung ebenfalls verstehen. Offensichtlich ist der Wirkung des saureren pH-Wertes bei höheren Giftkonzentrationen eine Schädigung des Photosynthesemechanismus überlagert.

## 2. Der spontane Zerfall der Ribulose,

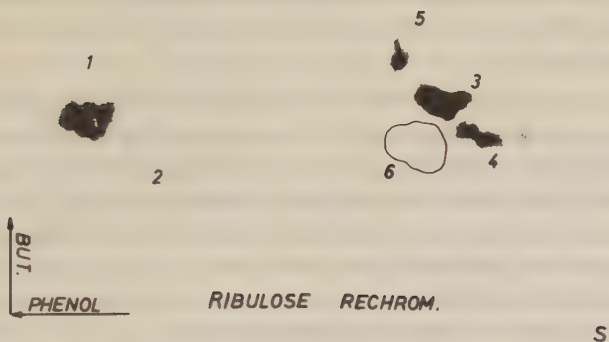


Abbildung 2. Einheitlicher Ribulosefleck erneut chromatografiert.  
(1 Ribulose, 2 Fructose, 3 Glycerinsäure, 4 Erythron-  
säure?, 5 nicht identifiziert, 6 Glutaminsäure).

In Zusammenhang mit der Identifizierung des Ribuloseoxims war aufgefallen, daß nach verschiedener Behandlung der Ribulose oder ihres Oxims immer wieder eine gleichartige Serie von neuen Flecken abgetrennt werden konnte. Diese Verbindungen traten erstaunlicherweise auch auf, wenn sehr sauber abgetrennte und vollkommen einheitliche Flecken von Ribulose (oder ihrem Oxim) vom Papier eluiert und erneut chromatografiert wurden (Abb.2). Als einzige Verunreinigung in dem ursprünglichen Fleck kommt höchstens eine Spur der ähnlich wie Ribulose laufenden Fructose in Betracht, nicht aber Substanzen mit grundsätzlich verschiedenen Rf-Werten. Man muß also annehmen, daß es sich bei den neu aufgetretenen Verbindungen um Umwandlungsprodukte der Ribulose handelt.

Der am meisten Radioaktivität enthaltende Fleck 3 wurde durch Cochromatografie in 4 Lösungsmitteln eindeutig als Glycerinsäure bestimmt. Fleck 4 verhält sich bei pH 5.5 wie eine neutrale Substanz und läuft bei pH 9.2 etwas weniger wie Glycerinsäure. Dies deutet auf eine Carbonsäure, die leicht in ihr Lacton übergeht. Die Rf-Werte des Flecks stimmen mit den von Bassham und Calvin (1957) für D-Erythronsäure angegebenen überein.

Cochromatografie war nicht möglich, da keine D-Erythronsäure zur Verfügung stand. Die Identität kann also nicht mit absoluter Sicherheit angegeben werden. Die Struktur der übrigen Zerfallstücke konnte wegen der geringen verfügbaren Aktivitäten nicht aufgeklärt werden.

Tabelle 2 zeigt, daß das Ausmaß des Zerfalls der Ribulose von der Lagerungszeit des entsprechenden Chromatogramms abhängt. Ein ähnlicher Effekt läßt sich für Glucose und Fructose selbst nach vierjähriger Lagerung nicht feststellen.

Aus dem spontanen Zerfall der Ribulose unter den Bedingungen der Chromatografie lassen sich verschiedene Schlüsse ziehen. Da die Phosphat-ester der Ribulose gegen Alkali noch sehr viel weniger stabil sind als der freie Zucker (Cohen 1953), dürfte der Schluß erlaubt sein, daß sie auch auf dem Papier schneller zerfallen als dieser. Beim Dephosphorylieren der Diphosphate erscheint sehr regelmäßig auch etwas Glyzerinsäure (Abb.1 und Tabelle 12) neben einer weiteren unbekannten Substanz (Abb.1 Nr.9). Die Reduktion der 3-Phosphoglyzerinsäure macht die intermediäre Bildung von 1-3-Diphosphoglyzerinsäure notwendig. Man nahm daher bisher an, daß ein Teil dieser sehr labilen Verbindung die Bedingungen der Extraktion übersteht und somit in den Diphosphaten enthalten sein könnte. Durch die hier besprochenen Befunde dürfte sicher sein, daß dies nicht der Fall ist und daß die aus den Diphosphaten isolierte Glyzerinsäure aus dem Zerfall des Ribulosediphosphats stammt.

Daß ein weiteres Bruchstück der Ribulose wahrscheinlich Erythronsäure ist, erklärt das Auftreten von Erythronsäurephosphat auf den Chromatogrammen von Moses und Calvin (1958). Diese Autoren hatten angenommen, daß die Säure durch Oxydation des im Pentosecyclus beteiligten Erythrosephosphats entsteht.

Der Zerfall der Ribulose weist auf die besondere "Eignung" der Verbindung als Substrat der Carboxylierung hin. Bei dem Zerfall entsteht sogar zum Teil offensichtlich das gleiche Produkt wie bei der carboxylierenden enzymatischen Spaltung, nämlich Phosphoglyzerinsäure.

| Lagerungszeit ungef. | Ribulose % | Bruchstücke % |
|----------------------|------------|---------------|
| 23 Monate            | 61         | 39            |
|                      | 45         | 55            |
| 1 Monat              | 90         | 10            |
|                      | 96         | 4             |

Tabelle 2. Einfluß der Lagerungszeit auf den Zerfall der Ribulose.

### 3. Das 1-2-cyclische Glucosemonophosphat.

Die nähere Charakterisierung der  $\text{PO}_4$ -Ester auf den Papierchromatogrammen geschieht im allgemeinen durch Chromatografie der freien Zucker nach Dephosphorylieren mit Polydase. Auf solchen Chromatogrammen ist immer ein beträchtlicher Teil der Radioaktivität in einem Fleck mit relativ kleinen  $R_f$ -Werten enthalten (Abb.1 Fleck 7), von dem man annehmen mußte, daß er  $\text{PO}_4$ -frei ist. Die Substanz läuft bei saurerer Elektrophorese mit der halben Geschwindigkeit der Glycerinsäure.

Wenn man Uridindiphosphatglucose (UDPG) bei pH 5.2 mit Polydase incubiert, entsteht neben Glucose der gleiche Fleck in beträchtlicher Menge. Dies deutet darauf hin, daß die gesuchte Verbindung in enger Beziehung zur UDPG steht. Es wurde daher angenommen, daß es sich um das Uridin-5-phosphat handeln könne. Da Versuche, diese Annahme durch Cochromatografie zu beweisen, zu keinem eindeutigen Ergebnis führten, wurde ein indirekter Weg beschritten. Die unbekannte Substanz wurde mit Substratmengen von authentischem Uridin-5- $\text{PO}_4$  vermischt und mit einer Phosphatase aus Bülensamenplasma (hergestellt nach der "simplified method" von Heppel und Hilmo 1951) incubiert, die sehr spezifisch die in 5'-Stellung von Nucleotiden veresterten  $\text{PO}_4$ -Reste abspaltet. Nach der Chromatografie ergab sich, daß dabei wohl inaktives Uridin entstanden war, die radioaktive Substanz aber unverändert blieb. Sie ließ sich durch Hydrolyse (0.1 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 40 h im Bombenrohr unter Luftausschluß bei 100°C erhitzt) in eine neue Verbindung überführen, die bei Elektrophorese im Boratpuffer nicht wie Uridin läuft. Cochromatografie bewies, daß ausschließlich freie Glucose entstanden war. Damit war der Nucleotidteil des UDPG-Moleküls ausgeschieden und gleichzeitig wurde die Aufmerksamkeit auf den Glucoseteil gelenkt.

Einen Schlüssel zur Identifizierung des unbekannten Flecks und seiner Einordnung in den allgemeinen Stoffwechsel lieferte die Beobachtung, daß man zu ihm auch gelangen kann, wenn man einen einheitlichen UDPG-Fleck erneut chromatografiert. Schon bei der erstmaligen Beschreibung der UDPG durch Leloir und Paladini (1952) wurde mitgeteilt, daß das Coferment bei milder alkalischer Hydrolyse in Uridin-5- $\text{PO}_4$  und in das sogenannte "glucose-1-2-cyclic phosphat" zerfällt. Ähnlich wie bei dem in III 2 beschriebenen Zerfall der Ribulose bewirkt also auch bei der UDPG eine extrem dünne Ausbreitung auf dem Papier einen Zerfall, der einer alkalischen Hydrolyse ähnlich ist. In einem scheinbar einheitlichen UDPG-Fleck sind also neben intakter UDPG noch Glucose-1-2- $\text{PO}_4$  und Uridin-5- $\text{PO}_4$  vorhanden. Letzteres entgeht bei Kurzzeitfixierungen der Aufmerk-

samkeit, da es noch nicht  $C^{14}$ -markiert ist.

Läßt man Polydase auf eine solche Mischung einwirken, so wird UDPG hydrolysiert und tritt als Glucose in Erscheinung, während das cyclische Glucose-1-2- $PO_4$  nicht angegriffen wird und unverändert zurückbleibt. Die Resistenz des Glucose-1-2- $PO_4$  gegen die Polydase wird verständlich, wenn man die Eigenschaften der darin enthaltenen Phosphatasen betrachtet. "Polydase" ist ein Mischenzympräparat aus *Aspergillus flavus* (oryzae). Dieser Pilz enthält Phosphatasen mit einem pH-Optimum von 2.3/3.6/7.9/8.7 (Varma und Srinivasan 1954). Der bei serienmäßigen Dephosphorylierungen verwendete Acetatpuffer pH 5.2 hat also eine nichtoptimale Wasserstoffionenkonzentration. Wenn man zu einem pH von 3.6 übergeht, spaltet Polydase auch das cyclische Glucose-1-2- $PO_4$  vollkommen zu freier Glucose. Es empfiehlt sich allerdings nicht, einen so sauren pH serienmäßig zu verwenden und somit das Vorkommen des Glucose-1-2- $PO_4$  zu umgehen, da dabei schlechte chromatografische Trennungen durch ausgefallene Eiweiße verursacht werden.

Der spontane Zerfall der Ribulose und der UDPG auf dem Chromatographiepapier sind dem Zerfall dieser Substanzen in alkalischer Lösung sehr ähnlich. Man könnte annehmen, daß auf dem Papier eine alkalische Hydrolyse stattfindet. Da wässrige Auszüge aus alten Chromatogrammen einen pH-Wert von 4.6 - 4.9 haben, kann es sich aber nur um Parallelerscheinungen handeln. Offensichtlich verursacht die Ausbreitung der geringen Substanzmengen über die Oberfläche der Papierfasern den spontanen Zerfall. Man kann hierbei die Wirkung der Papieroberfläche sicherlich mit der Oberflächenwirkung mancher anorganischer Stoffe bei Vorgängen der heterogenen Katalyse vergleichen. Die hier geschilderten Effekte sind insofern interessant, als sie die Reaktionsfähigkeit von UDPG und Ribulosediphosphat demonstrieren.

Auf den zweidimensionalen Chromatogrammen der Extrakte aus Algen nach  $C^{14}O_2$ -Assimilation tritt oft ein Fleck auf (Abb.3 Nr.8), der ähnliche Rf-Werte wie Triosephosphat hat und daher mit diesem leicht verwechselt werden kann. Auffällig ist, daß der Anteil dieses Flecks bei Vergiftung der Algen mit KCN stark ansteigt, was auf die alkalische Reaktion der Cyanidlösung zurückgehen dürfte. Dieser unbekannte Fleck konnte nämlich ebenfalls als das 1-2-cyclische Glucosemonophosphat identifiziert werden. Dies beweist, daß UDPG auch bereits bei der Aufbereitung der Extrakte zerfällt. Da zur Bildung der 1-2-cyclischen  $PO_4$ -Bindung offensichtlich eine Struktur "Nucleosid- $PO_4$ - $PO_4$ -Glucose" vorhanden sein muß, lassen

sich auch Vermutungen über den Aufbau einer weiteren unbekannten Substanz (Abb.3 Fleck 7) auf den zweidimensionalen Chromatogrammen anstellen. Dieser Fleck zeigt ähnliche Eigenschaften wie UDPG. Er zerfällt auf dem Papier teilweise in Glucose-1-2- $\text{PO}_4$ , läßt sich mit Polydase bei pH 5.2 in freie Glucose und Glucose-1-2- $\text{PO}_4$  und bei pH 3.6 vollkommen in freie Glucose aufspalten. Dies berechtigt zu dem Schluß, daß es sich um ein weiteres Coferment der Glucose-Übertragung handelt, welches ähnlich wie UDPG aufgebaut ist und anstelle von Uridin ein anderes Nucleosid enthält. Es wurde versucht, durch Messung des Absorptionsspektrums etwas über die Natur dieses Nucleosids zu erfahren. Da auf dem Papier stets nur geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen und gewisse Papierinhaltsstoffe eine Eigenabsorption im UV-Bereich haben, verliefen diese Versuche bisher negativ.

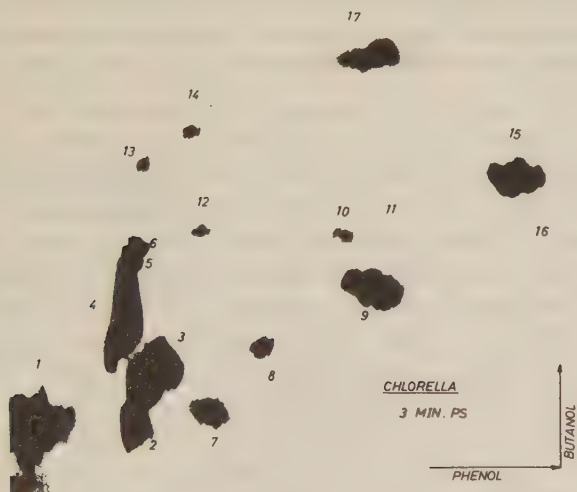


Abbildung 3. Alkoholextrakt aus Chlorella nach 3 Min. PS.

(1 Zuckerdiphosphate, 2 UDPG, 3 Zuckermomophosphate, 4 3-Phosphoglycerinsäure, 5 Phosphoglycolsäure, 6 Phosphoenolpyruvat, 7 neues Glucosenucleotid, 8 cyclisches Glucose-1-2- $\text{PO}_4$ , 9 Saccharose, 10 Glucose, 11 Fructose, 12 Asparaginsäure, 13 Zitronensäure, 14 Äpfelsäure, 15 Alanin, 16 Citrullin, 17 Glycolsäure).

Teil B. CO<sub>2</sub>-Assimilation und Glucosestoffwechsel bei *Ochromonas*  
*malhamensis* und deren Beeinflussung durch definierte  
Avitaminosen.

Die Entwicklung der Biochemie in den letzten 30 Jahren hat gezeigt, daß ursprünglich als "Vitamine" erkannte Stoffe als Wirkgruppen oder Cofermente eines Enzyms einen genau festgelegten Angriffspunkt im Stoffwechsel der Zelle haben. Kenntnisse über die Wirkung solcher Coenzyme bei grünen Pflanzen konnte man nur durch Analogieschlüsse zu tierischem Gewebe oder durch das Studium isolierter Enzymsysteme gewinnen, da grüne Pflanzen ihre benötigten "Vitamine" selbst zu bilden vermögen. Wird bei einer Pflanze die Synthese eines "Vitamins" durch eine Mutation ausgeschaltet, so äußert sich dieses sicher als Letalmutation, da bei Pflanzen eine Zuführung organischer Stoffe von Außen im allgemeinen nicht in Frage kommt. Verschiedene Flagellaten haben die Fähigkeit durch ihre dünne Membran feste Nahrungspartikel aufzunehmen. Diese teilphagotrophe Ernährungsweise ermöglichte die Selektion natürlicher Vitaminmangelmutanten, die sich zum Studium pflanzlicher Avitaminosen anbieten.

Zum Teil B der vorliegenden Arbeit wurde *Ochromonas malhamensis* gewählt. Diese Art wurde von Pringsheim (1952, 1955) erstmalig genau beschrieben und in Reinkultur gezogen. Sie gehört zu der Ordnung der Chrysomonadales und hat einen schalenlosen Protoplasten mit einer langen und einer kurzen Geißel. Stoffwechselphysiologisch ist sie durch eine Vielfalt von Ernährungsweisen gekennzeichnet. Neben der Fähigkeit zur Photosynthese (Myers und Graham 1956) vermag sie auch im Dunkeln zu wachsen und Glucose, Fett, Stärke, Bakterien sowie Individuen der eigenen Art aufzunehmen und zu verdauen (Pringsheim 1952). Glucose wird aerob normal veratmet und anaerob vergoren, wobei nichtstöchiometrische Mengen von Äthanol und Milchsäure entstehen (Reazin 1954, 1956). Zum maximalen Wachstum braucht *Ochromonas malhamensis* die Vitamine B<sub>1</sub> (Aneurin, Thiamin), B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) und Biotin (nach Provasoli und Pintner 1953, Hutner et al. 1953).

1. Auswahl geeigneter Anzuchtbedingungen.

Zur erstmaligen Reinkultur von *Ochromonas* verwendete Pringsheim einen Pepton-Leberextrakt-Nährboden und erreichte befriedigende Wachstumsraten. In späteren Arbeiten wurde meist das von Hutner et al. angegebene komplexe Medium in verschiedenen Variationen benützt. Da in dieser Arbeit unter Bedingungen gearbeitet werden sollte, bei denen

der Photosynthesemechanismus von *Ochromonas* dem der anderen Pflanzen möglichst gleicht, wurden zunächst die Auswirkungen verschiedener Nährböden auf den Stoffwechsel verglichen.

Bereits der Vergleich von Stickstoff- und Chlorophyllgehalt in Tabelle 3 zeigt, daß die Anzucht auf verschiedenen Substraten grundsätzlich verschiedene Zellen liefert. Der Pepton-Leber-Nährboden 1 liefert sehr chlorophyll- und stickstoffarme Flagellaten. Morphologisch sind es sehr kleine Individuen, in denen eine große "Chrysome"-Vakuole (= Polysaccharid s. Abschnitt 3) den Hauptteil des Zellvolumens einnimmt. Da auch der Chloroplast kaum sichtbar ist oder oft ganz fehlt, sehen sie ähnlich aus wie kleine *Ochromonas*-Zellen, die im Dunkeln gewachsen sind. Die auf Nährboden 2 gewachsenen Zellen liegen in Chlorophyll- und Stickstoffgehalt einerseits und in Vakuolen- und Chloroplastengröße andererseits zwischen den vorher beschriebenen und den auf dem komplexen Substrat 3 gezogenen Individuen. Letztere haben keine oder nur sehr kleine Vakuolen, der zweilappige Chloroplast erfüllt einen großen Teil der gut beweglichen Zelle. Man darf wahrscheinlich den niedrigen relativen Stick-

| Nährboden                               |   | 1    | 2    | 3    |
|-----------------------------------------|---|------|------|------|
| Stickstoffgehalt<br>N/mg Trockengewicht | a | 27.9 | 63.0 | 102  |
|                                         | b | 23.9 | 60.0 | 109  |
| Chlorophyllgehalt<br>/mg Trockengewicht | a | 1.2  | 4.7  | 17.8 |
|                                         | b | 1.8  | 5.3  | 20.0 |

Tabelle 3. Stickstoff- und Chlorophyllgehalt in Abhängigkeit vom Nährboden. (1 = 0.1 % Bacto-Trypton Difco + 0.1 % Glucose + 0.1 % Leberextrakt Difco pH 6.0, 2 = komplexes Medium nach Hutner et al. in dem die Aminosäuren und das Citrat durch 0.1 % Bacto-Trypton Difco ersetzt sind, 3 = nach Hutner). a und b sind die Extremwerte aus 3 bis 6 Versuchen. Anzucht im Licht.

stoffgehalt auf die Anhäufung von Reservestoffen und den geringen Chlorophyllgehalt auf schlecht entwickelte Chloroplasten zurückführen. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse einer größeren Anzahl von CO<sub>2</sub>-Assimilationsversuchen mit *Ochromonas*-Zellen unterschiedlicher Herkunft zusammengefaßt.

| Nährboden                                           | 1 (Pepton - Leber) |       |      |      | 2    | 3     |       |
|-----------------------------------------------------|--------------------|-------|------|------|------|-------|-------|
| Glucose                                             | +                  | +     | +    | -    | -    | -     | +     |
| Belichtung                                          | D                  | D     | L    | L    | L    | L     | L     |
| Zusatz (0,1 %) 5 Min.<br>vor der $C^{14}O_2$ Zugabe | -                  | Leber | -    | -    | -    | -     | -     |
| Fixierungszeit (Min.)                               | 6                  | 6     | 6    | 3    | 1    | 1     | 1     |
| Fixierung/Trockengew.<br>( $10^3$ ipm/1 Min/mg)     | 1.2                | 1.0   | 5.3  | 43.0 | 85.0 | 156.0 | 106.0 |
| 3-Phosphoglycerins.                                 | -                  | -     | 0.7  | 0.3  | 13.8 | 8.1   | 5.0   |
| Monophosphate + UDPG                                | -                  | -     | 2.2  | 9.9  | 33.9 | 27.7  | 20.9  |
| Diphosphate                                         | -                  | -     | -    | 1.0  | 5.0  | 4.0   | 3.7   |
| cycl.Glucose-1-2- $PO_4$ ?                          | -                  | -     | 3.1  | 12.1 | 8.4  | 1.8   | 1.0   |
| Polysaccharid                                       | -                  | -     | -    | 67.5 | 21.6 | 43.5  | 31.0  |
| Asparaginsäure                                      | 17.8               | 1.5   | 15.0 | 1.4  | 3.8  | 4.8   | 15.8  |
| Glutaminsäure                                       | 28.1               | 15.0  | 26.0 | 0.4  | 0.1  | 0.8   | 0.8   |
| Äpfelsäure                                          | 6.9                | 1.1   | 4.2  | 0.2  | 4.3  | 3.1   | 8.6   |
| Zitronensäure                                       | 10.4               | 1.8   | 2.6  | 0.3  | 5.1  | 3.3   | 4.2   |
| Fumarsäure                                          | 1.0                | 1.0   | 4.1  | 0.3  | 0.8  | -     | 2.4   |
| Bernsteinsäure                                      | 0.3                | 8,3   | 1.9  | -    | -    | 0.6   | -     |
| Alanin                                              | 3.9                | 3.8   | 12.0 | 1.5  | -    | 1.3   | 5.5   |
| Glutamin                                            | 3.5                | 40.0  | 4.2  | 0.4  | -    | -     | -     |
| Milchsäure                                          | 3.0                | 19.2  | 7.7  | 1.0  | -    | -     | -     |
| Glucose + Fructose                                  | -                  | -     | -    | 3.4  | 0.7  | -     | -     |
| Sonstiges                                           | 25.1               | 8.3   | 16.3 | 0.3  | 3.1  | 1.0   | 1.1   |

Tabelle 4. Fixierung von  $KHC^{14}O_3$  durch Ochromonas nach Anzucht auf verschiedenen Nährböden und Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fixierungsprodukte. Angaben in %. Algen während der Fixierung in dest.  $H_2O$  suspendiert. D = Dunkel, L = Licht, Nährböden wie Tabelle 3. Bei den Versuchen -Glucose wurden die Algen erst 2 Tage in normalem Nährboden herangezogen und dann für weitere 3 Tage in glucoserefreien Nährboden überführt.

Die Fixierungsraten sind nur als Angabe der Größenordnung zu verstehen, da anfänglich nicht mit Suspensionen gleicher Dichte und damit mit wechselnden Lichtintensitäten gearbeitet wurde und da das Trockengewicht bei so verschieden zusammengesetzten Zellen eine fragwürdige Vergleichsgröße darstellt.

Die Dunkelfixierung nach Anzucht auf normalem Pepton-Leber-Substrat führt zur Markierung verschiedener Säuren und Nebenprodukte des Zitronensäurecyclus. Wird 5 Minuten vor Beginn der Fixierung zusätzlich Leberextrakt gegeben, so werden die Schwerpunkte der Verteilung vollständig verschoben und die Radioaktivität hauptsächlich in Glutaminsäure, Glutamin, Bernsteinsäure und Milchsäure festgelegt. Der Stoffwechsel war also - wahrscheinlich an mehreren Stellen - blockiert. Die betreffende Umwandlungsreaktion stellte einen Engpaß dar, der durch die erneute Zuführung von Leberextrakt beseitigt wurde, worauf die in ein Minimum geratene Verbindung aus radioaktivem Material vermehrt nachgebildet wurde. Die entsprechenden "pools" (Sammelbecken) wurden aufgefüllt. Wurde die gleiche Algensuspension bei der Fixierung belichtet, so stieg die Einbaurrate zwar auf das Fünffache an, die Phosphatester und das Polysaccharid zeigten aber nur geringe Radioaktivität. Es fand also kaum "echte" Photosynthese über die Carboxylierung des Ribulosediphosphats statt. Bei Anzucht ohne Glucose ist die Fixierung um den Faktor 8 - 10 erhöht. Der größte Anteil der Radioaktivität findet sich nun in der Polysaccharidfraktion. Die erhöhte Einbaurrate ist in diesem Falle also aus einer Steigerung der Photosyntheseleistung zu verstehen.

Nährboden 2 unterscheidet sich von 1 dadurch, daß der Leberextrakt durch eine definierte Mischung aus Salzen und Vitaminen ersetzt ist. Wird *Ochromonas* darin ohne Glucose im Licht herangezogen, so ist die  $\text{CO}_2$ -Fixierung pro mg Trockengewicht noch mehr gesteigert und die Verteilung der Radioaktivität ist den von anderen Pflanzen bekannten Werten vergleichbar. Die niedere  $\text{CO}_2$ -Fixierung nach Anzucht auf Nährboden 1 dürfte also teilweise dem Fehlen von Salzen oder Vitaminen zuzuschreiben sein.

Geht man zu dem vollständigen Nährboden nach Hutner (3) über, ersetzt also nun das Pepton durch eine Mischung von Aminosäuren, so steigt die  $\text{CO}_2$ -Assimilation im Licht wiederum an. Dies ist in Übereinstimmung mit dem höheren Chlorophyll- und Stickstoffgehalt (Tabelle 3). Man kann also weiterhin schließen, daß das Pepton des Nährbodens 2 den Bedürfnissen von *Ochromonas* nicht in optimaler Weise gerecht wird. Die hier beschriebenen Effekte wurden nicht weiter verfolgt und sollen auch nicht weiter diskutiert

werden, da sie keine Aussage über einzelne Teilschritte der  $\text{CO}_2$ -Assimilation erlauben. Sie sollen lediglich dahingehend ausgelegt werden, daß zum Studium von Stoffwechselleistungen eine Anzucht von *Ochromonas* auf den Nährböden 1 und 2 nicht in Frage kommt, da sie keine ausreichende Ernährung gewährleisten.

Es wurde daher für die endgültigen Versuche ausschließlich das zusammengesetzte Nährmedium von Hutner et al. verwendet. Dieses liefert mit und ohne Glucose Zellen mit hohem Chlorophyll- und Stickstoffgehalt und weitgehend normaler Verteilung der Radioaktivität in den Photosynthesezwischenprodukten. Ohne Glucose herangezogene Organismen haben dabei einen höheren  $\text{CO}_2$ -Einbau, sodaß sie für Photosyntheseversuche eigentlich vorzuziehen wären. Um zu größeren Mengen glucosfrei gewachsenem Material zu gelangen, müßte man aber mit relativ alten Kulturen arbeiten, da *Ochromonas* ohne Glucose nur eine geringe Vermehrungsrate hat (Abb. 8a). Ältere Kulturen tendieren jedoch verstärkt dazu, in das von Pringsheim (1952) beschriebene amöboide Stadium überzugehen, was sicherlich auch physiologische Veränderungen nach sich zieht. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit vitaminverarmten Zellen wurden daher immer mit Kulturen gemacht, die auf Nährboden mit Glucose gewachsen waren.

Als nächstes wurde geprüft, wie rasch sich beim Fehlen der einzelnen Vitamine Auswirkungen auf das Wachstum feststellen lassen. Es wurde dazu eine relativ große Menge von gewaschenen *Ochromonas*-zellen in Nährboden geimpft, dem einer der essentiellen Stoffe fehlt. Sie wuchsen solange, bis die in den Organismen vorhandenen Vitaminmengen einen Minimalfaktor darstellte (Abb. 4, I. Passage). Am schnellsten bemerkbar macht sich  $\text{B}_{12}$ -Mangel, etwas weniger schnell  $\text{B}_1$ -Mangel, während sich das Fehlen von Biotin auf das Wachstum in der I. Passage wenig auswirkte. Daß man auf diese Weise trotzdem zu vitaminverarmten Zellen gelangt, zeigte sich, wenn man eine Probe der Suspension am 5. Tag in den entsprechenden Mangelnährboden weiterimpfte (II. Passage). Das Fehlen der einzelnen Vitamine läßt nun keinerlei Wachstum mehr zu. Die für die Vitaminmangelversuche verwendeten Kulturen befanden sich immer in einem Zustand analog der ersten Passage 5. Tag. Dieses frühe Stadium der Avitaminose mußte gewählt werden, da es wichtig erschien, nur Organismen im Anfangsstadium der Schädigung zu untersuchen. Dadurch sollte gewährleistet werden, daß möglichst die primären Angriffspunkte der einzelnen Vitamine aufgespürt wurden. Eine zu starke Verarmung würde durch die intensive Verzahnung der Stoffwechselvorgänge bewirken, daß sekundär auch andere Reaktionen beeinträchtigt werden.

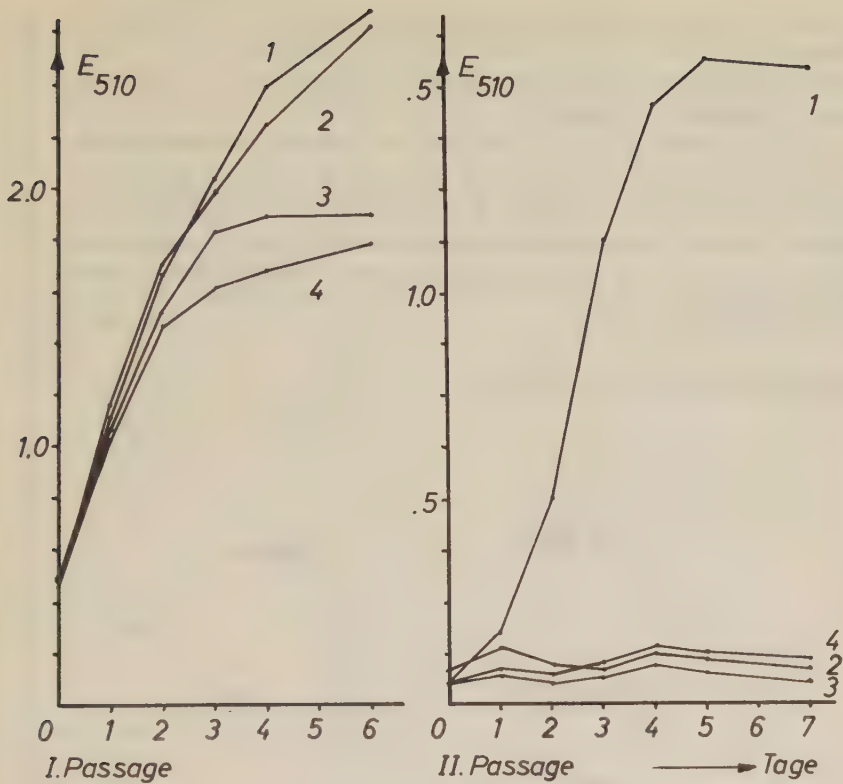


Abbildung 4. Wachstum von *Ochromonas* ohne Vitamine.

I. Passage: Zellen aus 4 ml gewaschen und in 50 ml weitergeimpft. II. Passage: am 5. Tag je 2 ml in 50 ml weitergeimpft. Extinktion bei 510 m $\mu$ , Schichtdicke 1 cm. 1 normal, 2 -Biotin, 3 -Thiamin, 4 -B<sub>12</sub>.

Um möglichst nur schwache Avitaminosen untersuchen zu können, mußten Zellen verschiedener Verarmungsgrade miteinander verglichen werden. Ihre Herstellung wurde auf Grund folgender Überlegung ermöglicht: Jede Zelle bringt einen gewissen Vitaminvorrat mit. Bis zur Erreichung der maximal möglichen Suspensionsdichte werden bei massiver Animpfung weniger Teilschritte ausgeführt als bei dünner. Dadurch wird die in der eingepfunden Zelle vorhandene Vitaminmenge bei großer Impfmenge auf weniger Tochterzellen aufgeteilt als bei kleiner, sodaß gegen Ende der Wachstumszeit Individuen mit unterschiedlichem Gehalt des betref-

fenden essentiellen Stoffes entstanden sind. Der unterschiedliche Verarmungsgrad läßt sich also durch abgestufte Impfmengen erreichen. Die Verarmungsgrade I - IV in den später beschriebenen Versuchen entsprechen folgenden Impfmengen: IV = 20 - 30 ml, III = 40 - 50 ml, II = 60 - 80 ml, I = 90 - 120 ml. IV ist also die stärkste Verarmungsstufe und I die schwächste Verarmungsstufe. Die Zellen aus der angegebenen Menge einer 5 Tage alten normalen Kultur wurden in 600 ml Nährboden überführt, dem das betreffende Vitamin fehlte. Die gleiche Impfmenge wurde zum Vergleich der Messwerte jeweils auch in vollständigen Nährboden eingebracht.

## 2. Die CO<sub>2</sub>-Assimilation im Dunkeln.

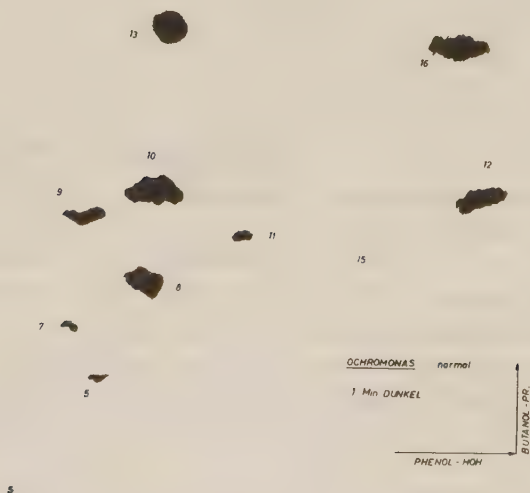


Abbildung 6. Dunkelfixierung von KHC<sup>14</sup>O<sub>3</sub> durch Ochromonas.

(5 Phosphoglyzerinsäure, 7 Phosphoenolpyruvat, 8 Asparaginsäure, 9 Zitronensäure, 10 Äpfelsäure, 11 Glutaminsäure, 12 Alanin, 13 Fumarsäure, 15 Glycin ?, 16 Milchsäure).

|                                 | a      |      |      | b        |       |         |         |
|---------------------------------|--------|------|------|----------|-------|---------|---------|
| Nährboden                       | normal |      |      | -Glucose |       | -Säuren |         |
|                                 |        |      |      |          | +Gluc |         | +Säuren |
| Zeit (Min.)                     | 0,25   | 1    | 3    | 1        | 1     | 1       | 1       |
| Fixierung ( $10^3$ ipm/mg Tgw.) | 4.4    | 17.2 | 25.6 | 6.6      | 9.0   | 14.3    | 9.6     |
| Asparaginsäure                  | 27.0   | 24.6 | 11.0 | 10.9     | 13.5  | 23.0    | 34.4    |
| Glutaminsäure                   | 2.0    | 1.6  | 2.1  | 2.1      | 1.9   | 1.0     | 3.0     |
| Äpfelsäure                      | 50.6   | 30.9 | 18.6 | 43.0     | 40.4  | 37.8    | 29.0    |
| Zitronensäure                   | 5.9    | 10.0 | 4.5  | 8.3      | 8.5   | 4.8     | 7.2     |
| Fumarsäure                      | 7.5    | 6.2  | 4.9  | 11.0     | 11.2  | 8.7     | 8.3     |
| Bernsteinsäure                  | 3.0    | 3.0  | 0.6  | -        | -     | -       | -       |
| PEP + PGS                       | 2.7    | 6.0  | 6.5  | 1.6      | 2.3   | 2.1     | 2.6     |
| Alanin                          | 1.0    | 7.0  | 21.2 | 13.4     | 13.0  | 12.0    | 9.4     |
| Milchsäure                      | 0.0    | 5.0  | 18.3 | 7.1      | 7.5   | 7.7     | 6.0     |
| Sonstiges                       | 0.3    | 5.7  | 12.3 | 2.6      | 1.7   | 2.9     | 0.1     |

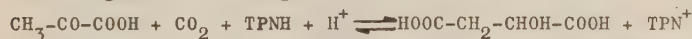
Tabelle 5. Verteilung der Radioaktivität nach Fixierung von  $\text{KHC}^{14}\text{O}_3$  im Dunkeln. Anzuchtsubstrat für b: 4 Tage normal, dann 2 Tage ohne Glucose, dann 1 Hälfte weiter ohne Glucose (-Glucose), andere Hälfte ohne Glucose, ohne Glutaminsäure bzw. Glutamat, ohne Citrat (-Säuren), beides 2 Tage. Bei +Glucose und +Säuren die fehlenden Nährbodenbestandteile 5 Min. vor der Fixierung zugesetzt. Angaben in %.

Abbildung 6 zeigt das Radioautogramm der löslichen Produkte nach kurzzeitiger Fixierung von  $\text{KHC}^{14}\text{O}_3$  im Dunkeln. Die Radioaktivität ist hauptsächlich in verschiedenen Säuren und Nebenprodukten des Zitronensäurecyclus enthalten. Die unlöslichen Produkte betrugen bei den Fixierungsversuchen mit *Ochromonas* im Licht und im Dunkeln immer weniger als 4 % der Gesamtfixierung. Hydrolyse der Zellreste mit 1 n HCl ergab, daß

sie die gleiche Zusammensetzung wie die löslichen Stoffe hatten. Sie wurden daher in allen folgenden Berechnungen und Darstellungen vernachlässigt.

Um die eigentliche Fixierungsreaktion näher beschreiben zu können wurde zunächst die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Verbindungen nach verschiedenen Fixierungszeiten festgestellt (Tabelle 5a). Mit kürzerer Zeit nimmt vor allem die Äpfelsäure und in etwas geringerem Maße die Asparaginsäure stark zu. Daraus darf man folgern, daß die Aufnahme des  $\text{CO}_2$  entweder direkt in diese Säuren oder in einen unmittelbaren Vorläufer erfolgt. In Frage kommen dafür mehrere Mechanismen.

Ochoa et al. (1948) beschrieben das sogenannte "malic enzyme", welches in tierischem und pflanzlichem Gewebe weit verbreitet ist (Vennesland und Conn 1952). Dieses Enzym katalysiert eine reduzierende Carboxylierung nach folgender Gleichung:



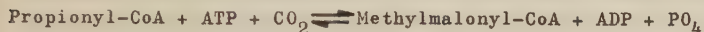
Brenztraubensäure wird unter Beteiligung von reduziertem Triphosphopyridinnucleotid direkt zu Äpfelsäure carboxyliert. Diese kann zur Oxal-essigsäure dehydriert werden, aus der durch Transaminierung Asparaginsäure entsteht. Die zweite Möglichkeit stellen Reaktionen dar, bei denen die zum Übergang Pyruvat/Dicarbonsäure notwendige Zuführung freier Energie nicht aus der Koppelung mit einem Reduktionsschritt sondern von energiereichen Phosphatgruppen stammt. Diese Reaktionen sind in ihren Teilschritten und vor allem in ihren Beziehungen zueinander noch nicht vollständig überschaubar. Bis jetzt sind vier Enzyme bekannt, die diesem Reaktionstyp entsprechen und die durch die Katalyse folgender Summengleichungen charakterisiert sind:

1. PEP-Carboxylase:  $\text{PEP} + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{Oxalacetat} + \text{PO}_4$ . (Bandurski 1955)
2. PEP-Carboxykinase:  $\text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{GDP (oder IDP)} \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + \text{GTP (ITP)}$ .  
(Utter und Kurahashi 1954).
3. PEP-Carboxytransphosphorylase:  $\text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{PO}_4 \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + \text{Pyrophosphat}$ . (Siu et al. 1961).
4. Pyruvat-Carboxylase:  $\text{Pyruvat} + \text{ATP} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + \text{ADP} + \text{PO}_4$ .  
(Utter und Keech 1960).

Darin bedeuten: PEP = Phosphoenolpyruvat, GDP = Guanosindiphosphat, IDP = Inosindiphosphat, ADP = Adenosindiphosphat.

Die Enzyme 1 und 2 sind aus vielen pflanzlichen und tierischen Geweben bekannt (Mazelis und Vennesland 1957), während 4 aus Leber isoliert wurde und auch in Aspergillus vorzukommen scheint (Woronick und Johnson 1960).

Enzym 3 wurde in Propionsäurebakterien nachgewiesen. Als weiterer Mechanismus für die Carboxylierung von Pyruvat kommt theoretisch noch eine Koppelung von Propionyl-CoA-Carboxylase (Stadtman et al. 1960) und Methylmalonyl-CoA-Oxalacetat-Transcarboxylase (Wood und Sternholm 1961) in Frage:



Summenmäßig ergibt sich dabei genau die gleiche Reaktion wie bei der Pyruvat-Carboxylierung nach Utter und Keech (1960). Interessanterweise ist auch die von Utter und Keech beschriebene Reaktion in noch unbekannter Weise von katalytischen Mengen Coenzym A abhängig.

Allen zuletzt besprochenen Möglichkeiten zur Carboxylierung von  $\text{C}_3$ -Körpern ist gemeinsam, daß sie zu Oxalacetat führen. Dieser Zwischenstoff steht einerseits durch Hydrierung mit der Äpfelsäure und andererseits durch Transaminierung mit der Asparaginsäure im Gleichgewicht. Die Konzentration an Oxalacetat selbst wird stets gering sein, da es eine sehr reaktionsfähige Verbindung ist. Welche der genannten Mechanismen in welchem Umfang für die Dunkelfixierung bei Ochromonas verantwortlich ist, lässt sich nicht ohne weiteres entscheiden. Die Frage wird in Zusammenhang mit den Vitaminmangelversuchen erneut aufgegriffen werden.

Geht man davon aus, daß die  $\text{CO}_2$ -Fixierung zunächst zur Markierung von Äpfelsäure und/oder Oxalessäure führt, so kann man das Auftreten von Radioaktivität in verschiedenen anderen Säuren leicht verstehen. Das aufgenommene  $\text{C}^{14}$  wird im Zitronensäurecyclus durch Kondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA weitergegeben, wodurch zunächst Zitronensäure markiert wird. Aus dieser wird über Isozitronensäure und Oxalbernsteinsäure die  $\alpha$ -Ketoglutaräure gebildet, welche zur radioaktiven Glutaminsäure transaminiert werden kann.

Schwieriger zu erklären ist der mit längerer Fixierungszeit zunehmende Anteil von Alanin und Milchsäure an der Radioaktivität. (Tabelle 5a). Ausgangsstoff für diese beiden Substanzen ist die Brenztraubensäure, aus der Alanin durch Transaminierung und Milchsäure durch Hydrierung entsteht. Die in diesen Verbindungen auftretende Radioaktivität hat also sicherlich den Weg über das Pyruvat genommen. Wenn man sich überlegt, daß dessen Bildung aus Äpfelsäure oder Oxalacetat die Umkehrung der im vorigen Abschnitt besprochenen Fixierungsreaktionen ist, ergibt sich eine

Möglichkeit zum Eintritt von Radioaktivität in diese Verbindung.

Der durch PEP-Carboxylase katalysierte Mechanismus ist allerdings nicht reversibel, da dabei anorganisches Phosphat frei wird. Auf diese Tatsache haben Tchen und Vennesland (1955) hingewiesen. Für die Rückreaktion kommen nur PEP-Carboxykinase, PEP-Carboxytransphosphorylase, Pyruvatcarboxylase und das malic enzyme in Betracht. Die Reaktion an letzterem führt zu freier Brenztraubensäure und dürfte damit für den Hauptteil der rückläufigen Markierung von Alanin und Lactat verantwortlich sein.

Da die aus  $C^{14}O_2$  gebildete  $\beta$ -hydroxy-Carboxylgruppe der Äpfelsäure durch die Decarboxylierung wieder abgespalten wird, kann es nur dann zu einer Markierung des Pyruvats kommen, wenn auch die zweite Carboxylgruppe der Äpfelsäure  $C^{14}$  enthält. Der starke Anteil der Fumarsäure an der Radioaktivität auch bei kürzester Fixierungszeit beweist, daß Äpfelsäure und Fumarsäure miteinander in einem durch die Fumaras/ vermittelten Gleichgewicht stehen. Damit wird über die symmetrische Fumarsäure

auch die Äpfelsäure in beiden COOH-Gruppen markiert und die geforderte Vorbedingung für eine Markierung des Pyruvats ist erfüllt. Die freie Brenztraubensäure ist auf den Chromatogrammen nicht vorhanden. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß ihre Konzentration geringer sein dürfte als die von Alanin und Lactat und daß sie außerdem bei der Chromatografie in den saueren Lösungsmitteln flüchtig ist.

Auch PEP und PGS, die oft schlecht getrennt und daher gemeinsam aufgeführt sind, zeigen bei längeren Fixierungszeiten einen nennenswerten Aktivitätsanteil. Geringe Mengen von Zuckerphosphaten sind meist vorhanden und in der Spalte "Sonstige" aufgenommen. Da eine direkte Phosphorylierung von Pyruvat mit ATP an der Pyruvatkinase aus energetischen Gründen unwahrscheinlich ist, müssen die Phosphatester durch Vermittlung der PEP-Carboxykinase oder der PEP-Carboxytranscarboxylase entstanden sein. Eine solche Synthese von Zuckern aus dem Pyruvatpool sieht man neuerdings auch als physiologische Aufgabe des Zusammenwirkens von malic enzyme und PEP-Carboxykinase an (Zusammenfassung bei Karlson 1961 und Fruton und Simmonds 1959). Etwas einschränkend sei noch angeführt, daß möglicherweise die vorhandenen Phosphatester aus einer auch im Dunkeln geringfügig ablaufenden Carboxylierung des Ribulosediphosphats stammen können.

Um den Einfluß von Substratzufuhr auf den Dunkelfixierungsprozess zu zeigen, sind in Tabelle 5b noch zwei Versuche mit verarmten Ochromonaszellen aufgeführt. Wenn man Ochromonas an Glucose verarmt, so wird die Fixierungsrate gering. Bei Zusatz von Glucose wird die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme deutlich gesteigert, ohne daß wesentliche Änderungen in der Verteilung auftreten. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß aus dem Glucose-Stoffwechsel sowohl das Substrat "Brenztraubensäure" als auch die zur Fixierung notwendigen energiereichen Cofermente stammen. Beides verringert sich bei Glucosemangel und wird bei Glucosefütterung plötzlich nachgeliefert, sodaß nun der  $\text{CO}_2$ -Einbau vermehrt stattfinden kann. Werden die Zellen zusätzlich noch an Glutamat und Citrat verarmt, diese Säuren des Zitronensäurecyclus also nicht mehr von außen zugeführt, so müssen sie ausschließlich durch Synthese aus  $\text{CO}_2$  und Pyruvat gewonnen werden. Dies hat zur Folge, daß die Fixierungsrate ansteigt. Gibt man die fehlenden Substrate nun wieder zu, so wird die Synthese zurückgedrängt und es wird weniger  $\text{CO}_2$  aufgenommen. Mit der Zugabe von Glutaminsäure wird gleichzeitig die Transaminierung angeregt und damit das Gleichgewicht Äpfelsäure/Asparaginsäure deutlich zu Gunsten der Asparaginsäure verschoben.

### 3. Die $\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht.

Wie im Abschnitt 1 bereits kurz dargelegt wurde, führt die photosynthetische  $\text{CO}_2$ -Assimilation bei Ochromonas unter den gewählten Bedingungen zu Fixierungsprodukten, die den durch Calvin et al. bei höheren Pflanzen und Grünalgen erstmalig beschriebenen entsprechen (Abb.7).

Neben den bei der Dunkelfixierung besprochenen Säuren sind eine Reihe von Phosphateestern vorhanden. Besonders auffällig ist ein sehr aktiver Fleck (1), der vom Startpunkt ausgehend sich nur in der Phenolrichtung erstreckt und der bei eindimensionaler Trennung manchmal auch in Butanol geringfügig wandert. Er läßt sich durch warmes Chloroform und warmes absolutes oder 80 % Äthanol nicht, durch warmes Wasser oder 25 % Äthanol dagegen gut vom Papier lösen. Bei saurerer Hydrolyse (1 n HCl, 90 Min.,  $100^\circ\text{C}$ ) wird die Substanz vollkommen in Glucose verwandelt. Es handelt sich also um ein Polysaccharid, das bei den verwendeten Aufarbeitungsmethoden im Gegensatz zur Stärke löslich ist.

Ein morphologisch in Erscheinung tretender Reservestoff der Chrysomonadales wurde früher als "Leucosin" bezeichnet. Nachdem es durch negativen Ausfall verschiedener Färbereaktionen ziemlich gesichert war, daß es sich dabei um ein Kohlenhydrat handelt, belegte Pringsheim (1952) den Stoff mit dem Namen "Chrysose".

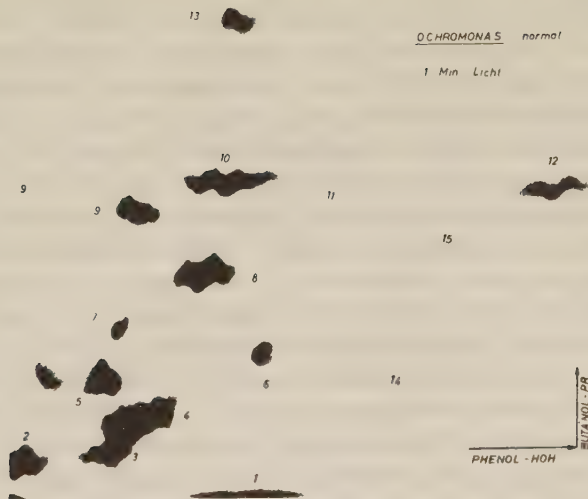


Abbildung 7. Lichtfixierung von  $\text{KHC}^{14}\text{O}_3$  durch *Ochromonas*.

(1 Polysaccharid=Chryseose, 2 Diphosphate, 3 UDPG, 4 Monophosphate, 5 3-PGS, 6 cycl.Glucose-1-2- $\text{PO}_4$ , 7 PEP, 8 Asparaginsäure, 9 Zitronensäure, 10 Äpfelsäure, 11 Glutaminsäure, 12 Alanin, 13 Fumarsäure, 14 Asparagin, 15 Glycocoll?)

Archibald et al. haben (1958) ein Polysaccharid aus *Ochromonas malhamensis* näher beschrieben. Es ist ein  $\beta$ -1-3-Glucan mit weitgehend linearer Anordnung von ungefähr 56 Glucoseeinheiten und enthält daneben noch geringe Mengen Mannose. Es ist wenig reduzierend und löst sich gut in Wasser. Da in *Aspergillus* eine sehr aktive  $\beta$ -1-3-Glucanase vorkommt (Stone 1957), wurde das radioaktive Polysaccharid mit dem *Aspergillus*extrakt "Polydase" bei pH 5.2 incubiert, wobei es vollständig zu Glucose hydrolysierte. Zweifellos sind also das radioaktive und das von Archibald et al. beschriebene Polysaccharid miteinander und weiterhin auch mit der Chryseose identisch. Das Auftreten von Mannose in den Hydrolysaten von Archibald et al. dürfte auf eine Verunreinigung des Rohproduktes zurückzuführen sein. In unseren Chromatogrammen blieb ein Teil der Chryseose am Ursprung haften und ein Teil wanderte in der Phenolrichtung. Ob es sich dabei um 2 natürlich vorkommende Polymerisationsgrade oder um eine Depolymerisation bei der Aufarbeitung wie bei der Stärke handelt (Gilbert 1958), kann nicht entschieden werden.

Hingewiesen sei noch auf die Tatsache, daß die hier für die Chrysose beschriebenen Eigenschaften sehr weitgehend auch für das aus Braunalgen der Gattung *Laminaria* isolierte Laminarin zutreffen (Mori 1953). Chrysose und Laminarin sind damit sehr nahe verwandte oder sogar identische Reservestoffe.

Das Auftreten von großen Mengen radioaktiver Uridindiphosphatglucose macht es wahrscheinlich, daß die Synthese der Chrysose durch Uridyl-Glucosyl-Transferasen vermittelt wird, wie es für folgende ähnliche Polysaccharide bewiesen werden konnte: Für ein  $\beta$ -1-3-Glucan aus *Phaseolus* von Feingold et al. (1958), für Cellulose aus *Acetobacter xylinum* von Glaser (1958), für Glycogen von Leloir und Goldemberg (1960) und für Stärke von Leloir et al. (1961).

Auffällig ist noch, daß bei der Fixierung von  $\text{CO}_2$  im Licht der im Dunkeln sehr starke Anteil der Milchsäure vollkommen verschwindet. Ihr Auftreten bei der Dunkelfixierung dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die hohe Schichtdicke im lollipop einen Sauerstoffmangel bedingt. Dadurch wird die Milchsäuregärung gefördert und es gelangt Radioaktivität aus dem Pyruvatpool in die Milchsäure. Im Licht liefert die Photosynthese genügend Sauerstoff um die Gärung zu verhindern.

Zum Studium des Fixierungsmechanismus wurde wiederum die Verteilung der Radioaktivität auf die Zwischenprodukte nach verschiedenen Incubationszeiten festgestellt. In Tabelle 6a sind die Ergebnisse einer solchen Versuchsserie zusammengestellt. Das als Endprodukt der Photosynthese anzusehende Polysaccharid ist erst bei längeren Fixierungszeiten stärker  $\text{C}^{14}$ -markiert, es entsteht also sekundär aus anderen markierten Verbindungen. Unter den Phosphateestern enthält die 3-Phosphoglyzerinsäure bei kurzen Zeiten den größten Anteil der Radioaktivität und fällt bei längeren Zeiten deutlich ab. Sie ist als das erste faßbare Zwischenprodukt der Photosynthese von *Ochromonas* zu betrachten, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Calvinschen Arbeitskreises steht. Daneben zeigen auch Äpfelsäure und Asparaginsäure mit kürzer werdender Zeit eine deutliche Zunahme. Der für die Dunkelfixierung verantwortliche Mechanismus arbeitet also auch bei Belichtung weiter.

Nach dem Dephosphorylieren der Phosphatester aus den eindimensionalen Chromatogrammen ergab die Diphosphatbande die freien Zucker Ribulose, Glucose, Fructose, Sedoheptulose (Tabelle 12) und die Monophosphatbande Ribose, Glucose, Sedoheptulose und Fructose. Aus der Phosphoglyzerinsäurebande ließ

|                                                   | a         |      |      |       | b         |       |
|---------------------------------------------------|-----------|------|------|-------|-----------|-------|
| Nährboden                                         | - Glucose |      |      |       | - Glucose |       |
|                                                   |           |      |      |       |           | +Gluc |
| Zeit (sec)                                        | 5         | 15   | 30   | 60    | 30        | 30    |
| Fixierung<br>(10 <sup>3</sup> ipm/mg Trockengew.) | 13.4      | 31.7 | 56.3 | 156.0 | 54.0      | 55.1  |
| 3 - PGS                                           | 35.3      | 26.5 | 13.0 | 7.0   | 9.0       | 20.5  |
| Monophosphate                                     | 28.2      | 24.0 | 23.0 | 20.6  | 21.5      | 22.9  |
| Diphosphate                                       | 6.4       | 7.0  | 7.0  | 4.0   | 3.5       | 7.0   |
| UDPG                                              | 5.3       | 4.7  | 8.2  | 6.8   | 8.1       | 7.5   |
| Polysaccharid                                     | 3.7       | 9.7  | 24.6 | 45.6  | 21.0      | 11.7  |
| Asparaginsäure                                    | 6.2       | 8.7  | 5.6  | 4.4   | 10.5      | 10.9  |
| Glutaminsäure                                     | -         | 0.3  | 0.3  | 0.5   | 0.4       | 0.5   |
| Äpfelsäure                                        | 9.4       | 8.3  | 5.7  | 3.0   | 10.5      | 10.9  |
| Zitronensäure                                     | 1.4       | 4.5  | 3.8  | 3.0   | 2.8       | 4.4   |
| Fumarsäure                                        | -         | -    | 0.8  | 0.7   | 1.0       | 1.1   |
| PEP                                               | 3.1       | 2.8  | 1.2  | 0.5   | 0.5       | 0.3   |
| Alanin                                            | -         | 1.2  | 1.6  | 1.9   | 5.7       | 2.9   |
| Glucose + Fructose                                | -         | -    | -    | -     | 3.1       | 0.8   |
| Sonstiges                                         | 2.1       | 2.2  | 5.2  | 2.0   | 2.0       | 1.4   |

Tabelle 6. Verteilung der Lichtfixierungsprodukte nach verschiedenen Fixierungszeiten (a) und nach Glucosefütterung (b). Bei + Glucose: 5 Min. vorher 0.1 % Glucose zugegeben. a und b sind unabhängig voneinander gemachte Versuche. Die Zusammensetzung der Diphosphate von b ist in Tabelle 12 aufgenommen. Verteilung in %.

sich neben einem Großteil Glycerinsäure noch eine kleine Menge Triose abtrennen. Das Vorkommen dieser Zuckerphosphate läßt vermuten, daß die eigentliche Fixierungsreaktion die Carboxylierung des Ribulosediphosphats ist und daß die Überführung der PGS in Hexose sowie die Resynthese des Ribulosediphosphats im Pentosecyclus analog dem von Calvin für andere Pflanzen vorgeschlagenen Schema erfolgt.

|                | 15 sec | 30 sec | 60 sec | Glucose<br>2-C <sup>14</sup> | Glucose<br>3-4-C <sup>14</sup> | Glucose<br>uniform |
|----------------|--------|--------|--------|------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| C <sub>1</sub> | 5.8    | 7.8    | 12.2   | 0.7                          | 1.1                            | 16.1               |
| C <sub>2</sub> | 6.2    | 7.4    | 5.8 ?  | 95.0                         | 1.8                            | 16.0               |
| C <sub>3</sub> | 32.7   | 30.0   | 28.1   | 1.3                          | 39.9                           | 16.0               |
| C <sub>4</sub> | 42.0   | 35.4   | 33.5   | 0.7                          | 52.1                           | 18.9               |
| C <sub>5</sub> | 6.4    | 9.5    | 9.6    | 1.1                          | 1.8                            | 16.9               |
| C <sub>6</sub> | 7.0    | 9.7    | 10.7   | 1.2                          | 1.2                            | 16.1               |

Tabelle 7. Verteilung der Radioaktivität im Molekül von Glucose aus den Monophosphaten nach verschiedener Belichtungszeit. Zur Kontrolle einige Abbauten von positionsmarkierter käuflicher Glucose. Angaben in % des Gesamtmoleküls.

Um die Funktion des Pentosecyclus zu zeigen, wurde die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen C-Atome des Glucosemoleküls ermittelt. Zum Abbau der Glucose diente das heterofermentative Milchsäurebakterium *Leuconostoc mesenteroides*. Nach Johnson und McClesky (1958) können verschiedene *Leuconostoc*-Stämme das intermediär aus C<sub>2</sub> + C<sub>3</sub> der Glucose gebildete Acetylphosphat (Hurwitz 1958) nicht vollkommen zu Äthanol reduzieren, sodaß teilweise auch etwas Essigsäure daraus entsteht. Um sicher zu gehen, daß der verwendete Stamm "Gibbs" wirklich nur Äthanol und keine zu berücksichtigende Menge Essigsäure bildet, wurde C<sub>2</sub>-markierte Glucose abgebaut. Essigsäure würde bei der gewählten Aufarbeitungsmethode zusammen mit der Milchsäure abgetrennt und ergäbe eine erhöhte Aktivität in C<sub>6</sub>. Dies konnte in mehreren Abbauten nicht beobachtet werden.

Eine weitere Fehlermöglichkeit ist dadurch gegeben, daß möglicherweise zelleigenes Material in unterschiedlichen Mengen nichtaktive Bruchstücke liefern und so die spezifische Aktivität verfälschen kann. Das müßte sich beim Abbau uniform markierter Glucose dadurch äußern, daß einzelne Atome sehr niedrige Anteilwerte zeigen. Dieser Effekt trat nicht auf. Die Fehlergrenze dürfte nach den Erfahrungen beim Abbau positionsmarkierter Glucosen bei ungefähr  $\pm 1.0\%$  pro Atom liegen.

Der Abbau von Glucose aus *Ochromonas* nach verschiedenen Fixierungszeiten zeigt, daß die Hexosen anfänglich stark 3-4-markiert sind. Dies entspricht den Gegebenheiten bei anderen Pflanzen, wo es dahingehend ausgelegt wurde, daß die Hexosen durch die Aldolase aus zwei Triosephosphaten zusammengesetzt werden. Diese Triosen sollen aus carboxylmarkierter 3-PGS durch Umkehr der Glycolyse entstehen. Weiter kann man feststellen, daß die anfänglich nur in 3-4-Stellung befindliche Aktivität nach einiger Zeit über das ganze Molekül verteilt wird. Dies spricht dafür, daß auch bei *Ochromonas* der von Calvin postulierte Pentosecyclus abläuft. Die in der Einleitung erwähnte Asymmetrie des Hexosemoleküls ist auch bei den Glucosen aus *Ochromonas* feststellbar. Sie soll erst in einer späteren Arbeit im Zusammenhang mit noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen über die Bedeutung der asymmetrischen Verteilung diskutiert werden. Hier sollen die Abbauergebnisse nur zeigen, daß bei *Ochromonas* ein Photosynthesemechanismus wie bei anderen grünen Pflanzen vorhanden ist.

#### 4. Der Einfluß von Glucosefütterung auf die Photosynthese.

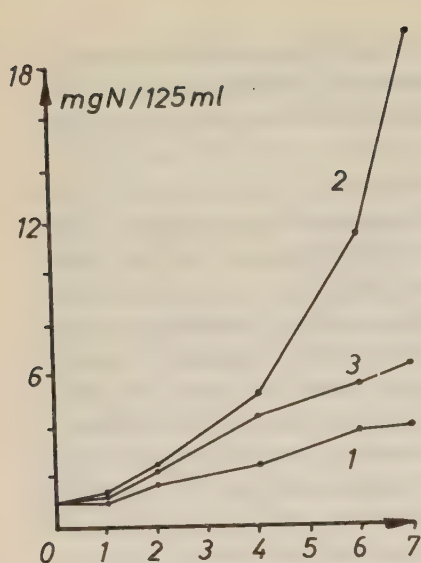
Bei den Versuchen zur Auswahl des geeigneten Nährbodens war bereits aufgefallen, daß sich die Lichtfixierung und der Chlorophyllgehalt durch Glucoseverarmung steigern lassen, was auch Myers und Graham (1956) feststellen. Um diesen Effekt näher beschreiben zu können, wurde die Entwicklung des Photosyntheseapparates beim Übergang von der heterotrophen zur autotrophen Lebensweise verfolgt.

Wird *Ochromonas* ungefähr 3 Wochen im Dunkeln kultiviert, so verschwindet der Chloroplast vollkommen und die fast unbeweglichen Zellen sind durch eine große Chrysosevakuoole gekennzeichnet. Solche Organismen wurden nun entweder im Dunkeln oder im Licht mit und ohne Glucose weitergezogen. In Abbildung 8 sind die dabei auftretenden Veränderungen einiger physiologischer Größen enthalten. Ohne Glucose im Licht ist das Wachstum relativ gering und nur wenig stärker als im Dunkeln, während die Vermehrung mit Glucose im Licht sehr viel schneller vor sich geht. Anfangs ist das Wachstum

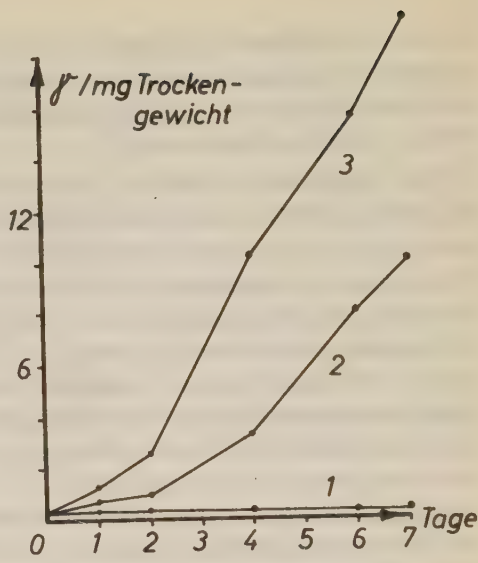
mit und ohne Glucose zwar ähnlich, da in beiden Fällen zunächst die angesammelte Chrysose aufgebraucht wird. Sobald der endogene Glucosevorrat erschöpft ist, fällt aber die Vermehrungsgeschwindigkeit auf dem glucosefreien Nährboden stark zurück.

Die Entwicklung der Chloroplasten wird durch das Licht induziert, eine Erscheinung die von eteilerten höheren Pflanzen hinlänglich bekannt ist. Dabei steigen der Chlorophyllgehalt und die  $\text{CO}_2$ -Fixierung stark an, wobei die glucosefrei gehaltenen Zellen sehr viel höhere Werte erreichen. Bezieht man die Fixierung durch die Photosynthese (Lichtfixierung - Dunkelfixierung) auf die Chlorophyllmenge, so steigt dieser Quotient bis zum 4. Tag mit und ohne Glucose in ungefähr gleichem Umfang an. Neben der Steigerung der Chlorophyllmenge durch Glucosemangel geht also in dieser Phase auch die Entwicklung des für die  $\text{CO}_2$ -Assimilation verantwortlichen Systems vor sich. Warum die Fixierungswerte pro Trockengewicht und pro Chlorophyll trotz weiterem Anstieg des Chlorophyllgehaltes nach einem Maximum am 4. Tag wieder abfallen, läßt sich aus den Versuchen nicht erklären.

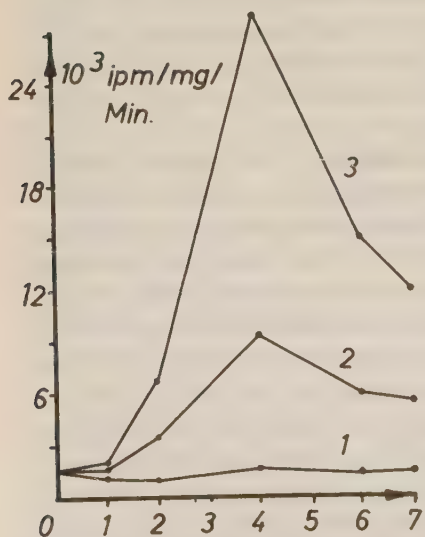
Aus dem Vergleich der in Tabelle 4 (Abschnitt b 1) aufgeführten Werte kann man zunächst ersehen, daß bei Anzucht auf Glucosenährboden die bei der Dunkelfixierung besprochenen Mechanismen auch bei der  $\text{CO}_2$ -Assimilation im Licht eine bedeutende Rolle spielen. Die beiden Fixierungswege sind nicht vollkommen voneinander abtrennbar, da über PEP und PGS Material ausgetauscht werden kann. Das Auftreten großer Mengen von Äpfelsäure und Asparaginsäure auch im Licht sprechen aber dafür, daß bei *Ochromonas* viel mehr  $\text{CO}_2$  durch "Pyruvat"-Carboxylierung aufgenommen wird, als dies bei anderen Pflanzen der Fall ist. Weiter geht aus Tabelle 4 hervor, daß die Steigerung des  $\text{CO}_2$ -Einbaus bei Glucoseverarmung allein der Fixierung durch Ribulose-1-5-diphosphat-Carboxylierung zuzuschreiben ist. Der Anteil der  $\text{PO}_4$ -Ester und des Polysaccharids ist erhöht, während die Assimilation in die Säuren zurücktritt. Letzteres stimmt mit dem Abfall der Dunkelfixierung bei Glucoseentzug überein. Da Glucoseentzug die Photosynthese steigert, wurde umgekehrt auch untersucht, ob die Zugabe von Glucose zu verarmten Zellen einen Einfluß ausübt. Tabelle 6 b zeigt, daß die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme bei Glucosezugabe nicht herabgesetzt ist. Die Carboxylierung läuft also mit der gleichen Geschwindigkeit weiter. Die Verteilung der Zwischenprodukte ändert sich aber auffallend. Der PGS- und Diphosphatanteil wird verdoppelt und das Polysaccharid sinkt auf die Hälfte ab. Die Auftrennung der Diphosphate nach dem Dephosphorylieren (Tabelle 12) ergibt, daß der Anstieg der Diphosphate vor allem durch eine Vermehrung des Fructosediphosphats hervorgerufen wird.



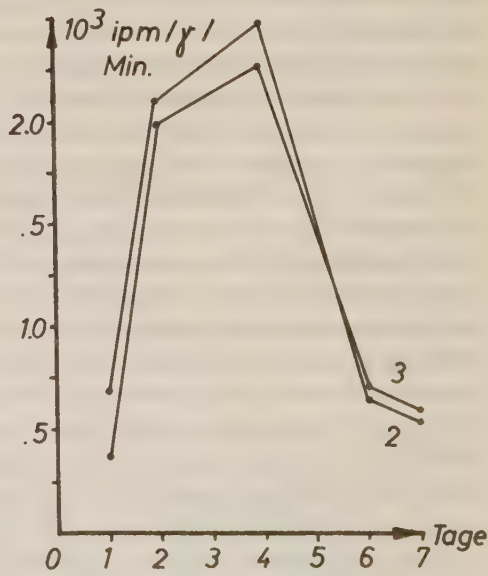
8a. Zuwachsrates



8b. Chlorophyllgehalt



8c. Lichtfixierung/Trockengewicht



8d. (Lichtfixierung-Dunkelfixierung) pro Chlorophyll

Abbildung 8. Adaptation von *Ochromonas* an Licht.

1 Dunkel + Glucose, 2 Licht + Glucose, 3 Licht - Glucose.

In später noch genauer zu besprechenden Versuchen wurde radioaktiv markierte Glucose zu Ochromonaszellen gegeben. Dabei zeigte sich, daß exogene Glucose im Licht vor allem als Polysaccharid festgelegt wird (Tab.14). Sie tritt also direkt in den Syntheseweg der Chrysose ein. Dadurch wird ein Teil des Fermentsystems oder des Coferments Uridinphosphat mit Beschlag belegt und steht für die aus der Photosynthese stammende Hexose nicht mehr zur Verfügung. Dies führt dazu, daß weniger  $C^{14}$ -Chrysose gebildet wird. Die von der Polysaccharidsynthese abgedrängte radioaktive Hexose staut sich als Fructosediphosphat auf und bewirkt ihrerseits durch Rückstau einen Anstieg der Phosphoglyzerinsäure.

#### 5. Der Einfluß von Thiamin auf die $CO_2$ -Assimilation im Dunkeln.

Bei den Untersuchungen mit thiaminverarmten Ochromonaszellen ergab sich zunächst ein unerwarteter Befund. Wie anfänglich üblich, wurden die Zellen in Wasser suspendiert. Dabei sanken  $CO_2$ -Fixierung, Glucosedissimilation und Atmung auf 3 - 8 % der Werte normaler Organismen ab. Die gelbschwarze Farbe solcher Suspensionen wurde durch einen mit der Zeit intensiver werdenden grünen Farbton ersetzt. Die Zeit bis zum Auftreten der grünen Farbe war bei starker Verarmung am kürzesten und nahm mit abnehmender Verarmung zu. Sie betrug beim Verarmungsgrad III ungefähr 20 Min., bei II ungefähr 1 Stunde und bei I ungefähr 3 Stunden, während nichtverarmte Zellen auch nach 8 Stunden noch keine Veränderung zeigten.

Eine solche Farbänderung tritt beim Abtöten von Ochromonassuspensionen durch Erhitzen oder Übergießen mit Alkohol immer auf. Sie erklärt sich aus der bekannten Tatsache, daß bei den Chrysomonadales das Chlorophyll von einer dünnen Schicht gelber Farbstoffe (Karotin, Fucoxanthin, Lutein) überdeckt ist (Strasburger 1958). Bei der Zerstörung der lebenden Struktur wird diese Überdeckung aufgehoben und die grüne Farbe des in viel größeren Mengen vorhandenen Chlorophylls läßt die Suspension grün erscheinen. Das Auftreten des grünen Farbtones beim Einbringen thiaminverarmter Ochromonaszellen <sup>in Wasser</sup> konnte also als Anzeichen für ein Absterben der Organismen gewertet werden.

Die mikroskopische Kontrolle ergab, daß der Zellkörper dabei zunächst ballonförmig auf das 4 - 5 fache seines Volumens anschwillt und dann zerplatzt. Die Ochromonaszellen können also offensichtlich bei Thiaminverarmung ihr osmotisches Gleichgewicht nicht mehr erhalten. Verwendete man zum Nährboden isotonische Kochsalzlösung als Suspensionsflüssigkeit, so konnte das Absterben vermieden werden.

Bei diesen Versuchen ergab sich außerdem, daß normale Zellen bei Suspension in NaCl-Lösung eine gesteigerte  $\text{CO}_2$ -Assimilation zeigen. Es wurden daher bei allen in den folgenden Abschnitten beschriebenen Versuchen auch die normalen Organismen in Kochsalzlösung suspendiert.

Die stufenweise Thiaminverarmung von *Ochromonas* führt zu Veränderungen an den Zellen, die sich bereits morphologisch bemerkbar machen oder durch einfache Messung zu ermitteln sind. Zunächst läßt sich ein Abfall des Sauerstoffverbrauchs feststellen, dem ein Abfall des Wachstums parallel geht (Tabelle 9). Die Gesamtkultur wird heller, da der Chlorophyllgehalt abfällt. Gleichzeitig werden die Chloroplasten kleiner und bei stärkerer Verarmung in ihrer Kontur unscharf. In diesem Stadium beginnt eine deutliche Chrysosevakuole aufzutreten, die bei noch stärkerer Avitaminose sehr groß wird und ähnlich wie bei Dunkelzellen den Hauptteil des Zellkörpers einnimmt. Offensichtlich kann die Glucose des Nährbodens noch aufgenommen aber nicht mehr verwertet werden und wird daher verstärkt als Polysaccharid angehäuft. Dabei tritt die Bildung von Protein zurück. Dies äußert sich in einem starken Absinken des Stickstoffgehaltes pro Trockengewicht. Bei der Vitaminverarmung nimmt der Quotient fettfreie Trockenmasse/Trockenmasse leicht zu. Mit der vermehrten Bildung von Polysaccharid ist also keine Anhäufung von Fett verbunden.

Auch bei der Fixierung von  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  im Dunkeln treten auffallende Veränderungen auf. Sie ist ungefähr in gleichem Maße herabgesetzt wie Wachstum und Atmung. Bei der Verteilung der Radioaktivität auf die Zwischenstoffe sind zwei Effekte besonders bemerkenswert. Der prozentuale Anteil von Alanin und Milchsäure ist stark vermindert und der von Glutaminsäure und Zitronensäure stark vermehrt. Diese Veränderungen lassen sich aus unserem derzeitigen Wissen von der Funktion des Thiamins im Stoffwechsel erklären. Thiamin fungiert in Form seines Pyrophosphats (TPP) als Coferment, das Aldehyde überträgt. In dem hier allein interessierenden Glucosestoffwechsel ist TPP bei der oxydativen Decarboxylierung von Brenztraubensäure (Korkes et al. 1952) und von  $\alpha$ -Ketoglutarsäure (Kaufman et al. 1953) beteiligt. (Neuere Darstellung vergleiche Karlson 1961).

Wenn das Coferment in den thiaminverarmten *Ochromonas*-zellen fehlt, wird die oxydative Decarboxylierung von Pyruvat verlangsamt ablaufen und die Säure staut sich an. Dies bewirkt, daß die für die Aufnahme von  $\text{C}^{14}$  in die Brenztraubensäure verantwortliche Rückreaktion des malic enzymes unterdrückt wird. Außerdem bedingt die Erhöhung der absoluten Menge eine Verminderung der spezifischen Aktivität von Pyruvat. Diese beiden Effekte

| Verarmungsgrad                               | II   |      | III  |      | IV   |      |
|----------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Vitamin B <sub>1</sub>                       | +    | -    | +    | -    | +    | -    |
| Atmungsgröße bezogen auf Stickstoffgehalt, % | 100  | 82   | 100  | 76   | 100  | 55   |
| Wachstumsrate berechnet aus Stickstoffgeh. % | 100  | 89   | 100  | 74   | 100  | 39   |
| Fixierung ( $10^3$ ipm/0.1 mg N)             | 10.8 | 8.1  | 20.9 | 14.9 | 22.2 | 10.1 |
| Fixierung (%)                                | 100  | 75   | 100  | 71   | 100  | 45   |
| Asparaginsäure                               | 26.9 | 20.5 | 29.4 | 37.7 | 26.2 | 50.0 |
| Glutaminsäure                                | 0.9  | 9.2  | 1.8  | 15.4 | 1.0  | 18.0 |
| Äpfelsäure                                   | 14.0 | 9.3  | 12.1 | 6.2  | 17.4 | 7.1  |
| Zitronensäure                                | 4.3  | 13.7 | 6.4  | 18.0 | 5.2  | 10.0 |
| Fumarsäure                                   | 3.9  | 3.3  | 2.0  | 0.5  | 3.1  | -    |
| PEP + PGS                                    | 7.3  | 4.3  | 7.2  | -    | 5.9  | 4.0  |
| Alanin                                       | 30.5 | 23.6 | 24.5 | 9.0  | 23.7 | 7.0  |
| Milchsäure                                   | 10.8 | 10.0 | 11.9 | 3.6  | 8.6  | 1.0  |
| Sonstiges                                    | 1.4  | 6.1  | 4.7  | 9.6  | 9.4  | 2.9  |

Tabelle 8. Dunkelfixierung von  $\text{KHC}^{14}\text{O}_3$  bei Thiaminverarmung.  
1 Minute Fixierungsdauer. Anteile in %.

addieren sich und führen zu einer stark verminderten Markierung der Brenztraubensäureabkömmlinge Alanin und Milchsäure.

Durch die verlangsamte Decarboxylierung von Pyruvat wird auch das Angebot an Acetyl-CoA verringert. Die Kondensierung von Oxalacetat und Acetyl-CoA und damit die Weitergabe von Radioaktivität im Zitronensäurecyclus wird also ebenfalls abfallen. Hieraus erklärt sich der relativ hohe Anteil der Asparaginsäure. In dem nur mehr in vermindertem Umfang ablaufenden Zitronensäurecyclus ist durch die stark verlangsamte Decarboxylierung der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure ein weiterer Engpaß entstanden. Dadurch kommt es zu einem Anstau dieser Säure, was sich in einer vermehrten Bildung von Glutaminsäure und einem Anstieg des Zitronensäureanteils äußert.

Da die Äpfelsäure bei normalem Stoffwechsel zum Teil aus dem vollkommenen Durchlauf des Zitronensäurecyclus zurückgebildet wird, verursachen die beschriebenen Blockierungen auch einen Abfall der Äpfelsäurekonzentration in der Zelle. Dies dürfte für den niederen Anteil der Äpfelsäure an der Radioaktivität mitverantwortlich sein.

Hauptsächlich ist der niedere Äpfelsäureanteil allerdings sicherlich auf folgende Ursache zurückzuführen. Die Drosselung von Glycolyse und Zitronensäurecyclus führen dazu, daß der Durchsatz stark abnimmt. Damit geht die Produktion an reduzierten Pyridinnucleotiden zurück. Da die Oxidation in normalem Umfang ablaufen dürfte, sinkt das Niveau von  $\text{DPNH}_2$  in der Zelle stark ab, was auch durch die herabgesetzte Sauerstoffaufnahme angezeigt wird. Mit dem  $\text{DPNH}_2$ -Spiegel ist durch die Pyridinnucleotidtranshydrogenasen das  $\text{TPNH}_2$ -Niveau eng verbunden und wird daher ebenfalls abfallen. Der Mangel an diesem reduzierten Nucleotid wirkt sich auf die  $\text{CO}_2$ -Fixierung durch das malic enzyme aus. Die Gesamtfixierung geht zurück und der Anteil der Äpfelsäure an der Radioaktivität fällt stark ab. Eine Äpfelsäurebildung durch Hydrierung der in normalem Umfang gebildeten Oxallessigsäure kann nur in geringem Maße stattfinden, da das Gleichgewicht bereits normalerweise auf der Seite der Oxyssäure liegt (Fruton und Simmonds 1959). Dazu kommt noch, daß der Mangel an  $\text{DPNH}_2$  dieses Gleichgewicht vermehrt zu Gunsten der Oxallessigsäure verschiebt.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Veränderungen in der  $\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung thiaminverarmter Ochromonaszellen sind ein weiterer Beweis dafür, daß die Bildung von Äpfelsäure und Oxallessigsäure durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen erfolgt.

6. Die Photosynthese thiaminverarmerter Ochromonaszellen.

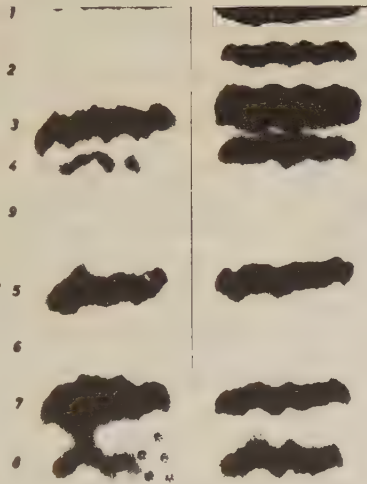


Abbildung 9.

Lichtfixierung ohne Thiamin.

1 Min. Fixierungszeit. Trennung

1-dim. Butanol/Propionsäure

Verarmungsgrad III.

Fixierungsrate auf 45% abgesunken.

1 Polysaccharid

2 Diphosphate

3 Monophosphate

4 PGS

5 Asparaginsäure

6 Glutaminsäure

7 Alanin + Zitronensäure

8 Äpfelsäure

9 PEP.

- Thiamin

normal

Bei der Assimilation von  $C^{14}O_2$  im Licht zeigten die thiaminverarmten Ochromonaszellen gegenüber normal gewachsenen große Unterschiede (Tabelle 9, Abbildung 9). Von den bei der Dunkelfixierung auftretenden Effekten ist lediglich der vermehrte Radioaktivitätsanteil der Glutaminsäure auch hier zu beobachten. Die auffälligste Veränderung ist aber der sehr starke Abfall der gebildeten Zuckermenge (Tab. 9b). Es geht dies hauptsächlich darauf zurück, daß der Anteil des Polysaccharids an der Radioaktivität vermindert ist und bei stärkerer Verarmung vollkommen verschwindet. Die Menge der gebildeten Säuren ist in viel geringerem Maße betroffen. Bei Thiaminmangel ist also hauptsächlich die photosynthetische  $CO_2$ -Fixierung gestört, woraus sich auch die niedere Gesamtfixierung erklären läßt.

Bei der Photosynthese ist das Thiaminpyrophosphat als Wirkgruppe des Ferments Transketolase am Pentosecyclus beteiligt. Das Enzym spaltet Ketosephosphate in ein Aldose-Phosphat und in Glycolaldehyd. Letzterer wird nicht frei, sondern bleibt am C-Atom 2 des Thiazolringes von TPP

| Verarmungsgrad                                   | II   |      | III  |      | IV    |      |
|--------------------------------------------------|------|------|------|------|-------|------|
| Vitamin B <sub>1</sub>                           | +    | -    | +    | -    | +     | -    |
| Atmungsgröße %                                   | 100  | 82   | 100  | 76   | 100   | 55   |
| Wachstum %                                       | 100  | 89   | 100  | 74   | 100   | 39   |
| Stickstoffgehalt/Trockengewicht (γ/mg)           | 109  | 105  | 115  | 115  | 111   | 85   |
| fettfreies Trockengewicht/Trockengewicht (mg/mg) | 0.72 | 0.76 | 0.75 | 0.77 | 0.76  | 0.78 |
| Chlorophyll (γ/mg Trockengewicht)                | 21.4 | 18.8 | 20.3 | 15.0 | 19.7  | 7.6  |
| Fixierung (10 <sup>3</sup> ipm/0.1 mg N)         | 51.6 | 43.8 | 81.0 | 42.2 | 102.2 | 43.4 |
| Fixierung %                                      | 100  | 85   | 100  | 52   | 100   | 42.4 |
| Fixierung/Chlorophyll (10 <sup>3</sup> ipm/γ)    | 2.6  | 2.4  | 4.6  | 3.2  | 5.7   | 4.8  |
| Phosphoglyzerinsäure                             | 4.5  | 7.0  | 5.1  | 9.9  | 4.5   | 5.0  |
| Monophosphate                                    | 16.9 | 22.8 | 17.0 | 21.7 | 17.7  | 17.4 |
| Diphosphate                                      | 3.7  | 4.5  | 5.3  | 3.6  | 3.8   | 1.8  |
| UDPG                                             | 4.0  | 1.9  | 5.0  | 2.0  | 4.0   | 2.2  |
| Polysaccharid                                    | 31.0 | 23.8 | 30.0 | 7.7  | 36.0  | 2.5  |
| Asparaginsäure                                   | 16.6 | 12.1 | 15.8 | 26.8 | 15.1  | 29.5 |
| Glutaminsäure                                    | 0.5  | 1.8  | 0.5  | 3.3  | 0.2   | 3.0  |
| Äpfelsäure                                       | 8.6  | 7.1  | 8.7  | 5.8  | 6.8   | 4.5  |
| Zitronensäure                                    | 4.2  | 6.4  | 4.4  | 0.8  | 3.5   | -    |
| Fumarsäure                                       | 2.4  | 1.7  | 1.0  | 3.5  | 0.7   | -    |
| PEP                                              | 0.6  | 1.1  | 0.7  | -    | 0.4   | 1.0  |
| Alanin                                           | 5.5  | 8.8  | 5.3  | 14.0 | 5.1   | 24.5 |
| Sonstiges                                        | 1.5  | 1.0  | 1.2  | 0.9  | 2.2   | 8.6  |

Tabelle 9 a. Fixierung von  $\text{KHC}^{14}\text{O}_3$  im Licht durch thiaminverarmte Ochromonaszellen. 1 Min. Fixierungsdauer.  
Gleiche Suspension wie Tabelle 8. Angaben in %.

| Verarmungsgrad                            | II   |      | III  |      | IV    |      |
|-------------------------------------------|------|------|------|------|-------|------|
| Vitamin B <sub>1</sub>                    | +    | -    | +    | -    | +     | -    |
| Asparaginsäure                            | 8.5  | 5.3  | 12.8 | 11.3 | 15.1  | 12.8 |
| Alanin                                    | 2.8  | 3.8  | 4.3  | 5.9  | 5.2   | 10.6 |
| Phosphoglyzerinsäure                      | 2.3  | 3.0  | 4.1  | 4.2  | 4.6   | 2.2  |
| Gesamtfixierung                           | 51.6 | 43.8 | 81.0 | 42.2 | 102.2 | 43.4 |
| Gesamtzucker                              | 28.7 | 23.2 | 46.4 | 14.8 | 62.8  | 10.2 |
| Gesamtsäuren mit Phosphoglyzerinsäure     | 22.1 | 20.1 | 33.6 | 27.1 | 37.1  | 29.3 |
| Dunkelfixierung aus Tabelle 8             | 10.8 | 8.1  | 20.9 | 14.9 | 22.2  | 10.1 |
| Differenz: Gesamtsäuren - Dunkelfixierung | 11.3 | 12.0 | 12.7 | 12.2 | 14.9  | 19.2 |

Tabelle 9 b. Absolutwerte der Tabelle 9 a.

Alle Angaben in  $10^3$  ipm/0.1 mg N.

gebunden und bildet so den "aktivierten Glycolaldehyd". Die intermediäre Bildung dieses Komplexes am TPP wurde schon lange vermutet und konnte neuerdings von Datta und Racker (1961) experimentell gesichert werden. Der aktivierte Glycolaldehyd wird auf die Aldehydgruppe von Aldosephosphaten übertragen, wodurch neue Aldosephosphate mit verlängerter C-Kette entstehen. Die Transketolase greift durch einen solchen Umbau von Zuckerphosphaten an folgenden 2 Stellen in die Regeneration des Ribulosediphosphats ein (nach Vishniac et al. 1957):

- 1)  $\text{Fructose-PO}_4 + \text{Glyzerinaldehyd-PO}_4 = \text{Erythrose-PO}_4 + \text{Xylulose-PO}_4$ .
- 2)  $\text{Sedoheptulose-PO}_4 + \text{Glyzerinaldehyd-PO}_4 = \text{Ribose-PO}_4 + \text{Xylulose-PO}_4$ .

Durch das Fehlen von TPP werden diese beiden Reaktionen zweifellos stark beeinträchtigt. Dadurch wird das wohlausgewogene Gleichgewicht des Pentosecyclus gestört und es kommt zu einem verminderten Angebot von Ribulosediphosphat, wodurch der gesamte Photosynthesemechanismus in seinem Ablauf gestört wird. Auf eine zu geringe Bildung von Ribulosediphosphat deutet in den Versuchen mit B<sub>1</sub>-verarmten Ochromonaszellen der verminderte Anteil der Diphosphate an der Radioaktivität hin. Den aus der Hemmung der Transketolase direkt erklärbaren Veränderung der Photosynthese ist noch ein anderer Effekt überlagert. In der Tabelle 9b ist die Differenz

zwischen den im Licht und im Dunkeln aus  $C^{14}O_2$  gebildeten gesamten Säuren aufgenommen. Diese Zahlen sind ein ungefähres Maß für die aus der photosynthetischen  $CO_2$ -Assimilation in die Säuren abgeflossenen Radioaktivität. Wenn man sie mit den in die Zucker aufgenommenen Radioaktivitätsmengen vergleicht, so kann man feststellen, daß mit zunehmender Thiaminverarmung der in die Säuren abfließende Anteil drastisch zunimmt. Der starke Anstieg des prozentualen und absoluten Anteils von Alanin zeigt, daß anscheinend die bei der Photosynthese gebildete Phosphoglyzerinsäure nicht mehr in normalem Umfang reduziert wird. Sie wird dadurch in den Atmungsstoffwechsel abgedrängt und verursacht so eine vermehrte Markierung von Brenztraubensäure. Da bei Thiaminmangel deren Weiterverarbeitung durch oxydative Decarboxylierung gehemmt ist, wird sie bevorzugt in Alanin aufgespeichert. Auf die mangelhafte Reduktion der PGS deutet auch der bei geringer Thiaminverarmung leicht erhöhte Anteil dieser Verbindung hin. Ähnliche Verschiebungen in der Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität lassen sich bei Chlorella durch Vergiftung mit Monojodessigsäure erreichen. Kandler et al. (1961) führen dies ebenfalls auf eine Reduktionshemmung zurück.

Die verminderte Reduktion von PGS in unserem Falle muß man wohl mit der Störung im Aufbau des Chloroplasten in Zusammenhang bringen. Die morphologischen Veränderungen und der Abfall des Chlorophyllgehaltes zeigen, daß von dem Thiaminmangel die Ausbildung des gesamten Chloroplasten betroffen wird. Da die Fixierungsrate bezogen auf die Chlorophyllmenge bei thiaminverarmten Organismen stets kleiner ist als bei normalen Zellen, kann die verminderte Chlorophyllmenge nicht der unmittelbare Grund für die mangelnde Reduktion von PGS sein. Möglicherweise geht mit dem gestörten Aufbau des Chloroplasten eine Störung im lamellären Feinbau parallel, sodaß man vielleicht eine mangelhafte Übertragung der "Reduktionskraft" von dem Energietransformationssystem auf das System der  $CO_2$ -Assimilation annehmen kann.

Bedenken muß man auch noch, daß es in thiaminverarmten Ochromonaszellen zu einer Anhäufung von Chrysose aus exogener Glucose kommt. Man kann sich vorstellen, daß es dadurch zu einem Rückstau der aus der Photosynthese angelieferten Hexose kommen kann. Der relativ hohe Anteil der Monophosphate an den Fixierungsprodukten wäre aus einer solchen Vorstellung verständlich. Es würde weiterhin bedingen, daß die nicht in die Zucker eintretende Radioaktivität zum Alanin abgedrängt wird.

Beim Vergleich der Fixierungsergebnisse normaler Ochromonaskulturen, die aus verschiedenen Impfmengen herangezogen waren (Tabelle 8 und 9), erkennt man, daß bei großer Impfmenge (=Kontrolle von B<sub>1</sub>-Verarmungsgrad II) die Dunkel- und Lichtfixierung von C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> kleiner ist als bei kleiner Impfmenge (=Kontrolle von B<sub>1</sub>-Verarmungsgrad IV). Diese Beobachtung läßt sich darauf zurückführen, daß bei massiver Animpfung die Vermehrungsrate gegen Ende der Wachstumszeit geringer ist als bei dünner Beimpfung. Dadurch werden die Einzelindividuen älter. Daß bei älteren Ochromonaszellen die CO<sub>2</sub>-Assimilation herabgesetzt ist, wurde aber bereits bei den Versuchen zur Lichtadaptation festgestellt.

# 7. Der Einfluß von Biotinmangel auf die Dunkelfixierung von CO<sub>2</sub>.



Abbildung 10. Fixierung von KHC<sup>14</sup>O<sub>2</sub> durch biotinverarmte Ochromonaszellen im Dunkeln. 1 Min. Fixierungsdauer.

(5 Zuckerphosphate, 7 PGS, 8 PEP, 9 Zitronensäure, 10 Äpfelsäure, 11 Glutaminsäure, 12 Alanin, 13 Fumarsäure, 16 Milchsäure, 15 Glycocol).

Wurden Ochromonaszellen in der angegebenen Weise an Biotin verarmt, so fixierten sie im Dunkeln sehr viel weniger  $C^{14}O_2$  als normale Organismen (Tabelle 10). In der Verteilung der Radioaktivität auf die gebildeten Zwischenstoffe ist das praktisch vollständige Verschwinden der Asparaginsäure die auffälligste Erscheinung (Abb.10). Der Anteil der Äpfelsäure und Zitronensäure zeigt einen weniger drastischen Abfall, während sich der verminderte Einbau bei Alanin, Milchsäure und den Phosphatestern nur in geringem Umfang bemerkbar macht. Diese Effekte lassen sich auf Grund der bekannten Wirkungsweise von Biotin im Stoffwechsel vollkommen erklären.

Für dieses Vitamin wurde eine Beteiligung an Carboxylierungsprozessen schon längere Zeit vermutet. Seine Funktion konnte allerdings erst durch Lynen et al. (1959) aufgeklärt werden. Sie fanden, daß Biotin die Wirkgruppe der  $\beta$ -Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase ist, welche im Fettstoffwechsel eine große Rolle spielt. An einem der beiden N-Atome des Biotins wird über eine Reihe von Zwischenstufen ein energetisch aktiviertes  $CO_2$ -Molekül gebunden und dann auf das entsprechende Substrat übertragen. Als Energiequelle dient dabei für ein Mol aktiviertes  $CO_2$  ein Mol ATP. Die Beteiligung eines am Biotin aktivierten  $CO_2$  ist inzwischen für folgende Reaktionen nachgewiesen worden: Carboxylierung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA (Stadtman et al. 1960), Transcarboxylierung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA (Wood und Stjernholm 1961) und für den Austausch der Carboxylgruppe von Pyruvat mit  $C^{14}O_2$  (Shuster und Lynen 1960). Offensichtlich stellt also die Aktivierung von  $CO_2$  ein allgemein gültiges Wirkprinzip für das Biotin dar.

Außerdem scheint Biotin aber auch noch auf andere Weise in die Synthese von Dicarbonsäuren einzugreifen. Ochoa et al. fanden eine stark verminderte Aktivität des malic enzymes in der Leber biotinfrei ernährter Truthähne und in *Lactobacillus arabinosus*, der ohne Biotin gewachsen war. Da in hochgereinigten Präparaten von malic enzyme kein Biotin vorhanden ist, nimmt man an, daß die Synthese des Enzyms auf noch unbekannte Weise biotinabhängig sei (Zusammenfassung bei Blanchard et al. 1950). Biotin ist demnach also an der durch malic enzyme katalysierten Reaktion nicht als  $CO_2$ -aktivierendes Zentrum im Lynenschen Sinne beteiligt.

In Frage kommt dagegen eine derartige direkte Beteiligung als Wirkgruppe bei der PEP-Carboxykinase, in der Lichstein (1957) gebundenes Biotin gefunden hat. Auch für die Pyruvat-Carboxylase dürfte eine Beteiligung als Wirkgruppe sicher sein, da dieses Ferment durch den sehr spezifischen Biotin-Antagonisten Avidin gehemmt wird.

| Vitamin                                              | Biotin |      |                                  |      | B <sub>12</sub> |      |
|------------------------------------------------------|--------|------|----------------------------------|------|-----------------|------|
| Verarmungsgrad                                       | III    |      |                                  |      | III             |      |
|                                                      | %      |      | 10 <sup>3</sup> ipm/<br>0.1 mg N |      | %               |      |
| Vitamin                                              | +      | -    | +                                | -    | +               | -    |
| Atmungsgröße bezogen auf<br>N - Gehalt. %            | 100    | 104  |                                  |      | 100             | 99   |
| Wachstum berechnet aus<br>N - Gehalt. %              | 100    | 95   |                                  |      | 100             | 72   |
| Stickstoff/Trockengewicht<br>(γ /mg)                 | 113    | 112  |                                  |      | 101             | 99   |
| Fettfreies Trockengewicht/<br>Trockengewicht (mg/mg) | 0.75   | 0.75 |                                  |      | 0.70            | 0.75 |
| Chlorophyll (γ/mg Trockengew.)                       | 20.0   | 20.6 |                                  |      | 20.1            | 19.7 |
| Gesamtfixierung (10 <sup>3</sup> ipm)                |        |      | 21.5                             | 8.8  | 10.8            | 10.6 |
| Fixierung %                                          | 100    | 41   |                                  |      | 100             | 98   |
| Asparaginsäure                                       | 30.4   | 0.3  | 6.54                             | 0.03 | 27.6            | 29.8 |
| Glutaminsäure                                        | 1.6    | 2.4  | 0.34                             | 0.21 | 1.6             | 3.1  |
| Äpfelsäure                                           | 14.7   | 11.2 | 3.16                             | 0.98 | 16.2            | 17.0 |
| Zitronensäure                                        | 6.3    | 2.8  | 1.35                             | 0.25 | 5.3             | 6.0  |
| Fumarsäure                                           | 1.8    | 4.0  | 0.39                             | 0.35 | 4.4             | 3.0  |
| PEP + PGS + Zucker-PO <sub>4</sub>                   | 6.0    | 12.2 | 1.29                             | 1.07 | 9.3             | 10.4 |
| Alanin                                               | 23.6   | 52.9 | 5.07                             | 4.65 | 25.0            | 22.0 |
| Milchsäure                                           | 10.2   | 11.9 | 2.19                             | 1.02 | 8.4             | 7.4  |
| Sonstiges                                            | 5.4    | 2.3  | 1.16                             | 0.20 | 2.0             | 1.6  |

Tabelle 10. Dunkelfixierung von KHC<sup>14</sup>O<sub>3</sub> durch biotin- und B<sub>12</sub>-verarmte Ochromonaszellen. Gleiche Suspensionen wie Tabelle 11. Fixierungszeit 1 Min. Bei -Biotin Durchschnittswerte aus 2 Versuchen.

Die beiden Enzyme Propionyl-CoA-Carboxylase und Methylmalonyl-CoA-Oxalacetat-Transcarboxylase werden ebenfalls durch Avidin gehemmt, sodaß auch der eventuell durch ihre Beteiligung bewirkte  $\text{CO}_2$ -Einbau bei Biotinmangel unterbunden sein dürfte.

Als Wirkgruppe der PEP-Carboxylase kommt Biotin kaum in Frage, da die  $\text{CO}_2$ -Aktivierung am Biotin obligat die Bildung eines intermediären Enzym-Biotin-Adenylats erfordert (Lynen et al. 1959). Dies ist aber bei der PEP-Carboxylase nicht möglich, da die Aktivierungsenergie direkt aus dem energiereichen Phosphoenolpyruvat stammt. Auch konnte eine Avidinhemmung bei diesem Enzym nicht beobachtet werden (Dr. M. Zenk, Bot. Institut der Universität München, persönliche Mitteilung). Das im Wirkungsmechanismus der PEP-Carboxylase sicher ähnliche Ferment PEP-Carboxytransphosphorylase scheint ebenfalls keine Biotin-Wirkgruppe zu haben, da es ebenfalls nicht durch Avidin gehemmt wird (Siu et al. 1961).

Die Beteiligung von Biotin als aktivem Zentrum ist damit nur bei Reaktionsmechanismen wahrscheinlich, die zur Bildung von Oxalacetat führen. Es konnte schon gezeigt werden (Abschnitt 2), daß sicherlich mehrere Carboxylasen bei der Dunkelfixierung von *Ochromonas* nebeneinander beteiligt sind und daß wahrscheinlich malic enzyme eine davon ist. Es ist naheliegend anzunehmen, daß Enzyme mit Biotin als Wirkgruppe von einem Biotinmangel früher betroffen werden als Enzyme, auf die sich der Vitaminmangel erst über den Umweg der Hemmung der Enzymsynthese auswirkt. Damit ist es möglich, daß malic enzyme noch aktiv ist, während die anderen Carboxylasen schon wirkungslos sind. Es kann kein Oxalacetat mehr direkt aufgebaut werden, was sich zunächst im Fehlen radioaktiver Asparaginsäure auswirkt. Die Unfähigkeit zur Asparaginsäurebildung bei Biotinmangel wurde bereits 1949 von Lardy et al. für *Lactobacillus arabinosus* beschrieben. Man konnte damals allerdings die Gründe dafür noch nicht übersehen.

Die gesamte aufgenommene Radioaktivität muß nach der Ausschaltung der direkten Oxalacetatbildung den Weg über das malic enzyme nehmen. Daß dieses Enzym noch aktiv ist, wird durch den hohen Anteil von Fumarsäure und Alanin bewiesen. Obwohl also die Bildung der radioaktiven Äpfelsäure unvermindert weitergeht, ist der Anteil und die absolute Menge der in ihr enthaltenen Radioaktivität abgefallen. Dies ist aus dem durch Biotinmangel bedingten Ausfall der direkten Bildung von Oxalacetat aus  $\text{C}_3$ -Körpern verständlich. Die Äpfelsäure wird nun vermehrt zur

Bildung der für den Ablauf des Zitronensäurecyclus benötigten Oxal-essigsäure herangezogen, wodurch ihre Konzentration und damit ihr Anteil an der aufgenommenen Radioaktivität abfällt. Da die Kondensation von Acetyl-CoA mit Oxalacetat in Richtung zur Zitronensäure eine stark exergone Reaktion ist ( $\Delta F' = -7.0$  Kcal pro Mol, pH 7.2, 22°C, nach Fruton und Simmonds 1959), ist sie gegenüber der Transaminierung stark bevorzugt. Bei niederen Oxalacetatkonzentrationen wird daher die aus der Äpfelsäure stammende Radioaktivität ausschließlich zur Zitronensäure weitergegeben und es tritt so gut wie keine radioaktive Asparaginsäure auf.

In Tabelle 10 fällt weiterhin auf, daß der Anteil der Phosphatester an der Aktivität zunimmt und daß der absolute Betrag der in ihnen enthaltenen Radioaktivität ähnlich wie beim Alanin nur geringfügig abnimmt. In Abschnitt 2 wurde für die Markierung der phosphorylierten Verbindungen die Rückreaktion der PEP-Carboxykinase, der Pyruvatcarboxylase oder der PEP-Carboxytransphosphorylase verantwortlich gemacht. PEP-Carboxykinase und Pyruvat-Carboxylase sind bei Biotinmangel offensichtlich inaktiviert. Die PEP-Carboxytransphosphorylase enthält kein Biotin. Sie scheint in *Ochromonas* nicht vorzukommen, da sonst bei Biotinmangel weiterhin Oxalacetat gebildet werden sollte. Somit können die Phosphatester nicht aus Reaktionen stammen, die durch diese Enzyme vermittelt werden. Die Bildung dieser Ester kann man sich eigentlich nur aus Pyruvat und ATP durch Umkehr der von der Pyruvatkinase katalysierten Reaktion vorstellen. Daß diese an sich energetisch unwahrscheinliche Bildungsweise in manchen Fällen realisiert ist, wird auch von Hiatt et al. (1958) für Muskelgewebe angenommen. Einschränkend sei nochmals erwähnt, daß möglicherweise aber auch eine im Dunkeln geringfügig ablaufende Carboxylierung von Ribulosediphosphat zur Markierung der Phosphatester führen könnte.

## 8. Der Einfluß von Biotinverarmung auf die Photosynthese.



Abbildung 11. Lichtfixierung biotinverarmter Ochromonaszellen.  
1 Min. Fixierungsdauer. (1 Polysaccharid, 2 Diphosphate, 3 UDPG, 4 Monophosphate, 5 PGS, 6 cycl.Glucose-1-2-monophosphat, 7 PEP, 8 Asparaginsäure, 9 Zitronensäure, 10 Äpfelsäure, 11 Glutaminsäure, 12 Alanin, 13 Fumarsäure).

Die bei der Dunkelfixierung beschriebenen Effekte zeigen, daß durch die gewählte Anzuchtmethode eine Biotin-Avitaminose gewährleistet war, obwohl der Fett- und Stickstoffgehalt sowie Wachstum und Atmung der Zellen weitgehend normal sind (Tabelle 10). Eine Erklärung dafür, daß das Wachstum von Ochromonas durch Biotinmangel erst relativ spät gehemmt wird, ist am Ende dieses Abschnittes gegeben. Der Chlorophyllgehalt (bezogen auf Trockengewicht) biotinverarmter Ochromonaszellen ist meistens etwas, in Einzelfällen bis zu 10 % gesteigert.

Die Fixierung von radioaktivem  $\text{CO}_2$  im Licht ist bei Biotinmangel stark erhöht. Dies geht vor allem auf eine starke Vermehrung der radioaktiven "Gesamtzucker" zurück. Der prozentuale Anteil der radioaktiven Säuren wird geringer, während ihre absolute Menge ungefähr gleichgeblieben ist.

| Vitamin                                             | Biotin |      |                                  |       | B <sub>12</sub> |      |
|-----------------------------------------------------|--------|------|----------------------------------|-------|-----------------|------|
|                                                     | %      |      | 10 <sup>5</sup> ipm/<br>0.1 mg N |       | %               |      |
|                                                     | +      | -    | +                                | -     | +               | -    |
| Gesamtfixierung<br>(10 <sup>5</sup> ipm/0.1 mg N)   |        |      | 91.6                             | 126.6 | 51.6            | 44.4 |
| Fixierung %                                         | 100    | 138  |                                  |       | 100             | 86   |
| Fixierung/Chlorophyll<br>(10 <sup>5</sup> ipm)      |        |      | 5.1                              | 6.9   | 2.6             | 2.2  |
| Phosphoglyzerinsäure                                | 4.8    | 6.4  | 4.39                             | 8.10  | 5.5             | 6.5  |
| Monophosphate                                       | 17.3   | 27.4 | 15.84                            | 34.68 | 16.9            | 17.7 |
| Diphosphate                                         | 4.6    | 4.1  | 4.21                             | 5.19  | 3.7             | 3.7  |
| UDPG                                                | 4.5    | 4.0  | 4.12                             | 5.06  | 4.0             | 4.8  |
| Polysaccharid                                       | 33.0   | 32.8 | 30.25                            | 41.52 | 31.0            | 30.2 |
| Asparaginsäure                                      | 15.5   | 0.7  | 14.20                            | 0.88  | 14.8            | 13.5 |
| Glutaminsäure                                       | 0.4    | 0.5  | 0.56                             | 0.63  | 0.5             | 0.8  |
| Äpfelsäure                                          | 7.7    | 7.7  | 7.05                             | 9.75  | 7.4             | 6.3  |
| Zitronensäure                                       | 4.0    | 2.7  | 3.06                             | 3.42  | 4.2             | 4.1  |
| Fumarsäure                                          | 0.9    | 1.2  | 0.82                             | 1.52  | 2.4             | 1.6  |
| PEP                                                 | 0.6    | 1.2  | 0.54                             | 1.51  | 0.6             | 1.3  |
| Alanin                                              | 5.2    | 9.6  | 4.76                             | 12.1  | 5.5             | 6.0  |
| Sonstiges                                           | 1.5    | 1.7  | 1.37                             | 2.15  | 2.5             | 2.3  |
| Gesamtzucker                                        | 59.4   | 68.3 | 54.40                            | 86.46 |                 |      |
| Gesamtsäuren (mit PGS)                              | 39.1   | 30.0 | 35.80                            | 37.95 |                 |      |
| Dunkelfixierung in die<br>Säuren (aus Tab.10, +PGS) |        |      | 21.50                            | 8.8   |                 |      |
| Differenz: Säuren im Licht<br>-Säuren im Dunkeln    |        |      | 14.30                            | 29.15 |                 |      |

Tabelle 11. Fixierung von  $\text{KHC}^{14}\text{O}_2$  im Licht durch biotin- und B<sub>12</sub>-  
verarmte Ochromonaszellen. Fixierungszeit 1 Min.  
Gleiche Algensuspension wie Tabelle 10.

|                                      | a : Biotin |      | b : - Glucose |          |
|--------------------------------------|------------|------|---------------|----------|
|                                      | +          | -    |               | +Glucose |
| Glucose + Sedoheptulose              | 38.2       | 37.9 | 37.6          | 36.6     |
| Fructose                             | 24.6       | 31.0 | 12.4          | 20.9     |
| Ribulose                             | 18.2       | 16.7 | 12.9          | 11.2     |
| cyclisches Glucose-1-2- $\text{P}_0$ | 15.0       | 12.2 | 33.1          | 27.7     |
| Glyzerinsäure                        | 4.0        | 2.2  | 4.0           | 3.6      |

Tabelle 12. Verteilung der dephosphorylierten Zucker aus den Diphosphaten. a aus biotinverarmtem Ochromonas (Tabelle 11), b aus glucoseverarmtem Ochromonas mit und ohne Glucose-fütterung (Tabelle 6 b).

Im Gegensatz zu thiaminverarmten Ochromonaszellen ist also bei biotinverarmten die Reduktion nicht gestört und die photosynthetische  $\text{CO}_2$ -Assimilation eindeutig gefördert.

Bei der Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fixierungsprodukte fällt zunächst auf, daß im Licht ebenfalls sehr wenig radioaktive Asparaginsäure gebildet wird. Die Synthese von Oxalacetat durch Carboxylierung von  $\text{C}_3$ -Körpern ist bei Biotinmangel also auch im Licht nicht möglich.

Die Differenz zwischen den im Licht und im Dunkeln gebildeten radioaktiven Säuren nimmt bei Biotinverarmung zu. Da dies besonders auf eine vermehrte Bildung von markiertem Alanin und PEP zurückzuführen ist, dürfte sicher sein, daß durch die verstärkte photosynthetische  $\text{CO}_2$ -Assimilation auch vermehrt  $\text{C}^{14}$  in den Glycolyseweg eingeschleust wurde. Bei Biotinmangel ist im Licht im Gegensatz zur Dunkelfixierung auch die gebildete Menge von  $\text{C}^{14}$ -Äpfelsäure und Fumarsäure erhöht und die radioaktive Asparaginsäure nicht mehr in so extremen Maße vermindert. Man darf somit annehmen, daß über das vermehrt markierte Pyruvat auch vermehrt  $\text{C}^{14}$  in den Zitronensäurecyclus eingeflossen ist.

Mit der Förderung der Photosynthese geht ein Anstieg des prozentualen Anteils der Phosphoglyzerinsäure und der Monophosphate einher, während der Anteil des Polysaccharids nicht steigt. Offensichtlich ist die Bildung

der Chrysose aus den Monophosphaten ein begrenzender Faktor, der mit der Steigerung der  $\text{CO}_2$ -Assimilation nicht Schritt halten kann. In Abschnitt 4 wurde ein im Prinzip ähnlicher Effekt beschrieben. Dort verursachte der Eintritt von exogener Glucose in den Syntheseweg des Polysaccharids gleichsinnige Verschiebungen der Photosyntheseprodukte. Möglicherweise ist dieser Aufstau der Hexosephosphate bei Biotinmangel für das verstärkte Abdrängen von Radioaktivität in den Glycolyseweg verantwortlich.

Wie in der Diskussion näher ausgeführt wird, wäre eine Beteiligung von Biotin bei der Carboxylierung des Ribulosediphosphats denkbar gewesen. Da die  $\text{CO}_2$ -Assimilation nicht vermindert ist, war diese Möglichkeit unwahrscheinlich geworden. Wäre der gesteigerten Photosynthese dennoch eine Schädigung der Carboxylierung überlagert, so müßte sich dies in einem starken Anstau des Ribulosediphosphats bemerkbar machen. In der Verteilung der einzelnen Zucker innerhalb der Diphosphate (Tab.12) ist der Anteil der Ribulose aber eher kleiner geworden, sodaß ein Anstau von Ribulosediphosphat nicht erfolgte. Lediglich der Anteil der Fructose an den Diphosphaten steigt an, was wohl auf die oben dargestellte Anhäufung von Monophosphaten zurückgehen dürfte.

In Abschnitt 10 wird gezeigt werden, daß bei Biotinmangel die Glucoseaufnahme von *Ochromonas* gehemmt ist. Diese Beobachtung erklärt auch die unerwartete Vergrößerung der Lichtfixierung in solchen Zellen. Bei den Untersuchungen über den Einfluß von Glucose auf die Assimilation von  $\text{CO}_2$  waren nämlich grundsätzlich ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen. Auch dort war bei Glucoseentzug die Chlorophyllmenge und die Fixierung (Abb.8) sowie der Anteil der Monophosphate und PGS erhöht (Tabelle 4). Dies dürfte hinreichend beweisen, daß die Erhöhung der Photosyntheseleistung durch Biotinmangel auf eine Störung des Glucosestoffwechsels zurückzuführen ist. Die verminderte Glucosedissimilation wurde durch eine erhöhte Photosyntheseleistung kompensiert.

Damit wird auch verständlich, daß trotz eindeutiger Biotin-Avitaminose das Wachstum erst spät gehemmt wird (Tabelle 11 und Abbildung 5). Anscheinend werden zuerst die Oxalacetatbildung und der Glucoseabbau geschädigt. Da aber die durch das malic enzyme gebildete Äpfelsäure als Oxalacetatquelle zum Ablauf des Zitronensäurecyclus ausreicht und die mangelhafte Glucosedissimilation durch die Photosynthese kompensiert wird, können die Organismen noch relativ lange in normalem Umfang wachsen. Die Wachstumshemmung bei noch stärkerer Verarmung an Biotin dürfte dann auf den Ausfall anderer Stoffwechselleistungen, wie zum Beispiel der Purinsynthese (Moat et al. 1956), zurückgehen.

## 9. Der Einfluß von B<sub>12</sub>-Mangel auf die CO<sub>2</sub>-Fixierung im Dunkeln und im Licht.

Da *Ochromonas malhamensis* zum Wachstum Vitamin B<sub>12</sub> benötigt, wurden auch einige CO<sub>2</sub>-Assimilationsversuche mit B<sub>12</sub>-verarmten Zellen gemacht. Bei deutlicher Wachstumshemmung waren Atmung und Stickstoffgehalt normal. Der Fett- und Chlorophyllgehalt waren ohne B<sub>12</sub> etwas vermindert (Tab.10). Die Fixierung von KHC<sup>14</sup>O<sub>3</sub> im Dunkeln war in Höhe und Verteilung der Fixierungsprodukte so gut wie unverändert.

Die CO<sub>2</sub>-Assimilation im Licht (Tabelle 11) war in allen Versuchen um 15 - 20 % abgesunken. Dabei waren in der Verteilung der Zwischenprodukte keine bemerkenswerten Veränderungen festzustellen. Der Abfall der Fixierung dürfte auf eine unspezifische Schädigung des Gesamtstoffwechsels zurückgehen.

Über die biochemische Wirkung von Vitamin B<sub>12</sub> ist noch wenig bekannt. Es scheint im Stoffwechsel von Methylgruppen eingeschaltet zu sein. So berichten Dinning et al. (1958), daß der Einbau von Ameisensäure in die Methylgruppe von Thymin B<sub>12</sub>-abhängig ist und Kisliuk (1961) sowie Takeyama et al. (1961), daß die Methylierung von Homocystein zu Methionin die Beteiligung von B<sub>12</sub> erfordert. Als gesichert anzunehmen ist die Beteiligung von B<sub>12</sub> auch bei Methylgruppenverschiebungen innerhalb eines Moleküls. Die Isomerisierung von  $\beta$ -Methyl-Asparaginsäure zu Glutaminsäure (Barker et al. 1958) und die Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA (Stadtman et al. 1960, Stjernholm und Wood 1961) sind von einem Faktor der B<sub>12</sub>-Gruppe abhängig. Auf welche Weise B<sub>12</sub>-Mangel zum Absinken der Photosyntheserate führen kann, läßt sich aus den angestellten Versuchen nicht beantworten.

## 10. Der Glucosestoffwechsel bei Biotinmangel.

Da sich verschiedentlich Beziehungen zwischen Photosynthese- und Glucosestoffwechsel ergaben, erschien es angebracht, auch die Auswirkung der Avitaminosen auf den Glucosestoffwechsel von *Ochromonas* in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Die Rolle des Thiamins beim Glucoseabbau ist hinreichend bekannt. Da die Steigerung der Photosyntheseleistung bei Biotinentzug erklärt werden sollte, wurde daher in erster Linie der Glucosestoffwechsel biotinverarmter Organismen untersucht.

### a. Dunkelversuche

Daß *Ochromonas malhamensis* Glucose aerob veratmet war bekannt (Reazin 1954). Die beiden hauptsächlich dafür in Frage kommenden Abbauwege sind

die klassische Glycolyse und der 6-Phosphogluconat-Weg nach Horecker ("shunt"). Man kann diese beiden Möglichkeiten auf einfache Art unterscheiden, indem man feststellt, in welchem Maße die Atome 1 und 6 der Glucose zur Bildung des entstehenden Kohlendioxids beitragen. Beim Embden-Meyerhof-Weg wird die Glucose zunächst in zwei Triosen gespalten. Damit sind die Positionen 1 und 6 gleichwertig,  $C_1$  wird sich zu  $C_6$  also wie 1 : 1 verhalten. Nach dem Horecker-Schema entsteht das  $CO_2$  direkt durch Decarboxylierung aus dem C-Atom.1. Der Rest des Moleküls wird entweder erst im Zitronensäurecyclus oder nach Umkombination durch die Transketolasen und Transaldolasen frei. Dabei fließt ein Teil der restlichen 5 Atome der Glucose in andere Kanäle des Stoffwechsels (z.B. Aminosäure- und Nucleotidsynthese) ab, während die im Atom 1 lokalisierte Radioaktivität höchstens in Form des gesamten Glucosemoleküls assimiliert werden kann. Es wird also aus Position 1 mehr  $CO_2$  stammen als aus Position 6. Messungen an Chlorella zum Beispiel ergaben  $C_1/C_6$ -Werte um 2.0, was für diese Alge einen leistungsfähigen Shunt-Mechanismus beweist (Kandler et al. 1961).

Fütterung von positionsmarkierter Glucose ergaben für Ochromonas folgende  $C_1/C_6$ -Verhältnisse:

Normale Zellen: 0.99 - 1.28 - 0.90 - 0.98 - 1.01 - 0.92.

Thiaminverarmte Zellen: 1.05 - 1.00 - 0.98.

Biotinverarmte Zellen : 1.02 - 0.99 - 0.95.

Die Werte wurden aufgeführt um die Schwankungsbreite der Messungen zu zeigen. Das  $C_1/C_6$ -Verhältnis liegt bei 1.0. Ochromonas baut also Glucose ausschließlich nach dem Embden-Meyerhof-Schema ab und kann Glucose nicht direkt oxydieren. Auch in vitaminverarmten Proben war das Verhältnis unverändert 1.0. Besonders das Ergebnis bei Thiaminverarmung erhärtet die Feststellung vom Fehlen des Horecker - Shunts, da man bei Verminderung der Transketolaseaktivität eine Verschiebung zu Gunsten von Position 1 erwarten dürfte.

In Tabelle 13 sind für biotinverarmte Ochromonaszellen die Meßwerte aufgeführt, wie sie zur Berechnung des  $C_1/C_6$ -Verhältnisses verwendet wurden. Die Algen hatten den Verarmungsgrad III und waren in der gleichen Weise herangezogen und vorbereitet wie für die Versuche zur  $CO_2$ -Fixierung. Die Biotinverarmung wurde kontrolliert, indem die Dunkelfixierung von  $KHC^{14}O_3$  in Parallelversuchen gemessen wurde. Sie war in dem hier aufgeführten Fall auf 54 % abgefallen.

| Biotin                                                   | +                 | -    |
|----------------------------------------------------------|-------------------|------|
| CO <sub>2</sub> aus C <sub>1</sub> -Glucose (ipm/l mg N) | 2685              | 2619 |
| CO <sub>2</sub> aus C <sub>6</sub> -Glucose (ipm/l mg N) | 2664 <sup>r</sup> | 2640 |
| C <sub>1</sub> /C <sub>6</sub> Verhältnis                | 1.01              | 0.99 |
| CO <sub>2</sub> -Produktion %                            | 100               | 98   |
| Sauerstoffverbrauch (mm <sup>3</sup> /l mg N)            | 122               | 117  |
| Atmung %                                                 | 100               | 96   |

Tabelle 13. Sauerstoffverbrauch und CO<sub>2</sub>-Produktion biotinverarmter Ochromonaszellen bei Fütterung positionsmarkierter Glucose (spez. Aktivität  $1.263 \times 10^3$  ipm/mg). Incubationszeit 145 Min. Gleiche Suspension wie Tab. 14.

Auf den entsprechenden Chromatogrammen war die Asparaginsäure vollkommen verschwunden, was eine starke Biotin-Avitaminose anzeigt. Solche Organismen produzierten aus radioaktiver Glucose in normalem Umfang CO<sub>2</sub>. Daraus läßt sich schließen, daß der Durchsatz von exogener Glucose durch die Glycolyse und den Zitronensäurecyclus nicht gestört ist. Da der Sauerstoffverbrauch ebenfalls fast gleich geblieben ist, muß man annehmen, daß die Bildung reduzierter Pyridinnucleotide und ihre Oxydation in der Atmungskette normal ablaufen.

Zur Messung der Glucoseaufnahme wurde die Algensuspension in den bei der CO<sub>2</sub>-Fixierung benützten "lollipop" gegeben, 5 Min. mit Luft durchströmt und dann mit radioaktiver Glucose incubiert. Um eine Assimilation des Atmungs-CO<sub>2</sub> zu vermeiden, wurde während der gesamten Fixierungsdauer ein kräftiger Strom von CO<sub>2</sub>-freier Luft durchgeleitet. Danach wurden die Algen rasch bei +2°C abzentrifugiert, mit kaltem Wasser gewaschen und durch Aufgießen von heißem Äthanol abgetötet. Die Radioaktivität wurde bestimmt und der Extrakt wie im Falle der CO<sub>2</sub>-Fixierung aufgearbeitet. Die aufgenommene Glucosemenge wurde nach der Chromatografie aus der gemessenen Gesamtradioaktivität durch Korrektur mit der auf den Chromatogrammen vorhandenen freien Glucose errechnet.

Tabelle 14 zeigt, daß bei Biotinmangel die aufgenommene Glucose auf die Hälfte der Normalwerte abgesunken ist. Einen gleichen Effekt beschrieben Carlson und Carlson (1949) beim Studium des Dextranaufbaues

| Biotin                                 | Dunkel |      | Licht |       |
|----------------------------------------|--------|------|-------|-------|
|                                        | +      | -    | +     | -     |
| Glucoseaufnahme ( $10^3$ ipm/0.1 mg N) | 7.12   | 3.7  | 24.78 | 30.01 |
| Glucoseaufnahme %                      | 100    | 52   | 100   | 121   |
| Polysaccharid                          | 66.2   | 68.6 | 94.3  | 90.9  |
| Phosphatester                          | 13.6   | 16.5 | 2.5   | 3.6   |
| Alanin + Milchsäure                    | 13.9   | 13.0 | 1.1   | 2.2   |
| Sonstiges                              | 6.3    | 3.3  | 2.1   | 3.3   |

Tabelle 14. Glucoseaufnahme biotinverarmter Ochromonaszellen und Verteilung auf die Fixierungsprodukte (%). 30 Min. uniform- $C^{14}$ -Glucose, spez. Aktivität  $15.1 \times 10^6$  ipm/mg. Gleiche Algen wie Tabelle 13. Erläuterung im Text.

aus Glucose bei Leuconostoc. Die Beobachtung wurde von Williams et al. (1957) für Hefe bestätigt. Gleichzeitig stellten diese Autoren auch eine verminderte Hexokinaseaktivität fest. Dadurch sollte nach ihrer Meinung eine zu geringe Phosphorylierung bedingt sein. Diese Ansicht wurde von Moat et al. (1958) übernommen, welche eine Steigerung der  $CO_2$ -Produktion aus Glucose feststellten, wenn sie getrocknete biotinverarmte Hefezellen 30 Min. mit Biotin vorincubierten.

#### b. Lichtversuche.

Wurde Ochromonas während der Glucoseassimilation belichtet, so stieg die Einbaurrate im allgemeinen auf das 1.2 - 1.6 fache, in einigen Fällen bis auf das 3-fache der Dunkelwerte an. Biotinverarmte Zellen assimilieren dabei stets die gleichen oder sogar größere Glucosemengen als die normalen Organismen (Tab.14). Die Steigerung gegenüber der Aufnahme im Dunkeln ist also bei Biotinmangel sehr viel größer als bei normaler Anzucht. Die Verteilung auf die einzelnen Stoffwechselprodukte zeigt, daß bei der Assimilation von Glucose im Dunkeln und im Licht ausschließlich solche Stoffe entstehen, die sich von Glucose-6-Phosphat ableiten. Die in der Zelle vorhandene gesamte Radioaktivität muß also ihren Weg über die Hexokinasereaktion genommen haben. Bei Belichtung wird durch die

einsetzende Photophosphorylierung (Übersicht bei Kandler 1960) der Hexokinasereaktion lediglich vermehrt ATP zugeführt. Wäre bei Biotinmangel die Aktivität der Hexokinase der begrenzende Faktor für die Glucoseaufnahme wie es Williams et al. annahmen, so dürfte durch ein vermehrtes ATP-Angebot nicht wesentlich mehr Glucose phosphoryliert werden. Vielmehr müßte sich durch die verstärkte Glucoseaufnahme der normalen Zellen der Effekt jetzt noch drastischer bemerkbar machen. Man muß daher annehmen, daß bei biotinverarmten *Ochromonas*-Zellen eine Inaktivierung der Hexokinase nicht der Grund für die verminderte Glucosephosphorylierung sein kann.

Die Steigerung auf das normale Maß durch die Lichtphosphorylierung zeigt vielmehr, daß im Dunkelstoffwechsel bei Biotinmangel ein vermindertes Angebot von ATP vorliegen muß. Zum gleichen Ergebnis gelangte Katsuki (1959), der einen erniedrigten ATP-Spiegel bei biotinverarmten Kulturen des Pilzes *Piricularia oryzae* feststellte. Er nahm an, daß dies durch den ebenfalls beobachteten niederen Gehalt an DPN bedingt sei. Dieser Grund scheint bei den Versuchen mit *Ochromonas* nicht in Frage zu kommen, da die normal ablaufende Atmung zeigt, daß der Wasserstofftransport in der Zelle nicht beeinträchtigt ist.

Die im Dunkeln erniedrigte Glucoseassimilation ist am sinnvollsten durch die Annahme erklärbar, daß der Biotinmangel eine Entkoppelung der Atmungskettenphosphorylierung verursacht. Als Entkoppelung bezeichnet man im allgemeinen den Befund, daß die aus der Oxydation des Substratwasserstoffes gewonnene Energie nicht in normalem Maß für die Bildung energiereicher Phosphatbindungen ausgenutzt werden kann. Ein solcher Effekt ist als Wirkung verschiedener Stoffwechselgifte (2-4-Dinitrophenol, Azid, Dicumaryl, das Hormon Thyroxin) bekannt.

#### IV. Diskussion der Ergebnisse.

Die Ergebnisse aus Teil A wurden bereits am Ende der entsprechenden Abschnitte ausführlich besprochen, sodaß hier nicht mehr gesondert auf sie eingegangen werden muß.

Auch in Teil B wurde die Bedeutung der einzelnen Versuche bereits in Zusammenhang mit den Ergebnissen erläutert. Hier soll nur noch zusammenfassend diskutiert werden, was für die Biochemie und Physiologie der  $\text{CO}_2$ -Assimilation und für den allgemeinen Stoffwechsel aus den Versuchen mit *Ochromonas malhamensis* zu folgern ist.

Wird *Ochromonas* auf einem komplexen Nährboden gezogen, so geschieht die photosynthetische  $\text{CO}_2$ -Assimilation genau wie bei anderen grünen Pflanzen durch Carboxylierung von Ribulosediphosphat. Daneben stellt aber die Carboxylierung von PEP oder Pyruvat einen weiteren  $\text{CO}_2$ -Einbauweg dar, der bei *Ochromonas* weitaus größere Bedeutung als bei anderen Pflanzen hat. Bassham + Kirk (1960) schätzen für *Chlorella* die Beteiligung dieses Weges an der  $\text{CO}_2$ -Fixierung auf 3 %, während die Verteilungstabellen für glucosereiche *Ochromonas*-zellen einen Anteil in der Größenordnung von 15 - 25 % vermuten lassen.

Für diesen Eintritt von  $\text{CO}_2$  in den Atmungsstoffwechsel sind mehrere Einzelreaktionen verantwortlich zu machen. Von den in Frage kommenden bekannten Enzymen sind malic enzyme und PEP-Carboxykinase oder Pyruvatcarboxylase wahrscheinlich gemacht worden. PEP-Carboxylase und PEP-Carboxytransphosphorylase kommen bei *Ochromonas* vermutlich nicht vor, da sie kein Biotin als Wirkgruppe haben und daher im Gegensatz zu dem Befund in Abschnitt 7 bei Biotinmangel nicht beeinträchtigt werden sollten.

Für die Markierung des Pyruvatpools kommt außer der Rückreaktion des malic enzymes noch ein direkter Austausch der Carboxylgruppe mit  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  in Frage. Ein entsprechendes Enzym wurde in *Clostridium* gefunden (Wolf und O'Kane 1955). Da dieser Austausch biotin- und thiaminabhängig ist (Shuster und Lynen 1960), müßten sich Anhaltspunkte für sein Vorkommen bei den Versuchen mit vitaminverarmten Organismen ergeben. Bei Biotinmangel sind aber Alanin und Milchsäure vermehrt markiert und ihr verminderter Anteil an der Radioaktivität bei Thiaminmangel konnte zwanglos aus der Hemmung der oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat erklärt werden. Es ist daher nicht wahrscheinlich, daß der direkte Austauschmechanismus bei *Ochromonas* zum Einbau von  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  in das Pyruvat beiträgt.

Die Beeinflussung der Fähigkeit zur Photosynthese durch den Glucose-stoffwechsel demonstriert anschaulich die teilweise autotrophe und teilweise heterotrophe Lebensweise von *Ochromonas*. Beim Fehlen von Glucose wird die autotrophe Seite angeregt. Andererseits können die Organismen aber auch im Dunkeln mit Glucose als Energiequelle wachsen. Maximales Wachstum wird erst erreicht, wenn beide Stoffwechseltypen zusammenwirken und sich ergänzen können (Abb.8a).

Die Auswirkung von Avitaminosen auf den Stoffwechsel von *Ochromonas* läßt sich zum Teil auf bekannte Funktionen von Vitaminen als Cofermente zurückführen, zum Teil sind die Effekte aber aus unserem heutigen biochemischen Wissen nicht erklärbar und stellen daher Angriffspunkte für weitere Untersuchungen dar.

Die Störung des osmotischen Gleichgewichts bei Thiaminmangel ist vollkommen verständlich. Aus den Grundgesetzen der physikalischen Chemie wissen wir einerseits, daß zur Aufrechterhaltung und Herstellung eines Konzentrationsgradienten Arbeit geleistet werden muß. Andererseits besitzen wir aus der Biochemie exakte Vorstellungen über die energieliefernden und energieübertragenden Systeme der lebenden Zelle. Über die Verbindung zwischen beidem, nämlich über den Mechanismus der Arbeitsleistung gegen einen Gradienten, ist so gut wie nichts sicheres bekannt. Zu diesem Problemkreis gehört auch die Osmoregulation. Aus Wasserorganismen muß das eindringende Wasser aktiv entfernt werden. Im Falle von *Ochromonas* geschieht dies durch eine pulsierende Vakuole. Die Störung bei Thiaminmangel kann entweder auf einem vermehrten Eindringen infolge veränderter Permeabilitätseigenschaften der Membran oder auf einer verminderten Exkretion beruhen. In beiden Fällen lassen sich aus dem weiteren Studium des Thiamineffekts Aufschlüsse über den Wasserhaushalt der lebenden Zelle erwarten.

Die Wirkung von  $B_1$ -Mangel auf die Dunkelfixierung zeigt deutlich die Bedeutung des Thiaminpyrophosphats für den Atmungsstoffwechsel. Die physiologische Aufeinanderfolge der Einzelreaktionen der Glycolyseketten und des Zitronensäurezyklus wurde im wesentlichen aus Hemmversuchen mit Enzymgiften gefolgert. Solche Gifte sind meist für einzelne Fermente spezifisch und führen durch deren Ausschaltung zum Anstau des entsprechenden Substrats. Die besprochenen Versuche mit vitaminverarmten Organismen stellen einen Parallellfall dazu dar. Es wurden hier durch Entzug der Wirkgruppe die Fermente der oxydativen Decarboxylierung gewissermaßen auf eine physiologische Weise inaktiviert und dadurch im Ablauf des Glucoseabbaus Engpässe erzeugt,

die zum Anstau von Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure führten.

Auf die Photosynthese wirkt sich Thiaminmangel in zweierlei Weise aus. Das Verhältnis der aus der photosynthetischen  $\text{CO}_2$ -Fixierung gebildeten Säuren und Zucker ist deutlich zu Gunsten der Säuren verschoben. Offensichtlich wird das fixierte  $\text{CO}_2$  nicht mehr in normalem Umfang reduziert. PGS staut sich aber trotz der gestörten Reduktion nicht in dem drastischen Maße an, wie es zum Beispiel beim Vergiften des Reduktionsschrittes mit Monojodessigsäure der Fall ist. Anscheinend ist also auch die Carboxylierung vermindert, was sich aus dem verminderten Ribulosediphosphat-Angebot durch Hemmung der Transketolase im Pentosecyclus erklären läßt.

Da eine direkte Beteiligung des Thiamins beim Reduktionsvorgang nicht vorstellbar ist, kann dessen Störung bei  $\text{B}_1$ -Avitaminose nur auf der beobachteten Degeneration des Chloroplasten beruhen. Auffällig ist, daß durch Thiaminmangel ein ähnlicher Abbau des Chloroplasten hervorgerufen wird, wie bei der Anzucht im Dunkeln. In beiden Fällen tritt dabei auch eine große Polysaccharidvakuole auf. Man darf sicherlich annehmen, daß der Photosyntheseapparat im Dunkeln abgebaut wird, weil er überflüssig geworden ist. Entsprechend ist es naheliegend anzunehmen, daß durch die Hemmung der Photosynthese bei Thiaminmangel eine "physiologische Dunkelheit" eintritt und daß der überflüssige Teil des Chloroplasten zurückgebildet wird. Einschränkend muß natürlich in Betracht gezogen werden, daß durch die starke Störung des Gesamtstoffwechsels auch ein vermindertes Angebot an Bausteinen für die Chloroplastensynthese die mangelhafte Ausbildung verursachen könnte.

Biotinmangel wirkt sich auf die Dunkelfixierung von  $\text{CO}_2$  durch eine starke Inaktivierung der PEP-Carboxykinase oder der Pyruvatcarboxylase aus. Aus diesem Befund konnte geschlossen werden, daß die verwendeten Organismen mit Sicherheit eine starke Biotinavitaminose hatten.

Damit ist auch eine exakte Aussage über eine eventuelle Beteiligung des Biotins bei der Photosynthese möglich geworden. In der Einleitung wurde die niedere Aktivität der isolierten Carboxydismutase als Beweis dafür betrachtet, daß in vivo möglicherweise eine energetische Aktivierung des  $\text{CO}_2$  der Carboxylierung des Ribulosediphosphats vorausgeht. Seit der Aufklärung der biochemischen Funktion des Biotins wurde eine eventuelle Beteiligung des Vitamins an dieser Aktivierung vermutet (Calvin und Pon 1959). Wäre Biotin die Wirkgruppe eines der Enzyme der Carboxylierung von Ribulosediphosphat, so müßte sich in biotinverarmten *Ochromonas*-

zellen Ribulosediphosphat anstauen, die Assimilation von  $\text{CO}_2$  zurückgehen und der Anteil der PGS an der Radioaktivität abfallen. In den Versuchen mit biotinverarmten Ochromonaszellen konnte keiner dieser Effekte beobachtet werden. Die Photosyntheseleistung war bei Biotinmangel nicht vermindert, sondern sogar gesteigert und die Verteilung der Radioaktivität auf die Zwischenstoffe war weitgehend normal. Diese Ergebnisse beweisen eindeutig, daß eine Aktivierung von  $\text{CO}_2$  am Biotin bei der Photosynthese nicht beteiligt ist.

Bei biotinverarmten Organismen wurde im Dunkeln eine verminderte Glucoseassimilation festgestellt. Der Effekt kann durch Belichtung aufgehoben werden. Es wurde daher angenommen, daß bei Biotinmangel durch eine Entkoppelung der Atmungskettenphosphorylierung ein vermindertes ATP-Angebot vorliegt. Diese Annahme macht auch die von Carlson und Carlson (1949) und Williams et al. (1957) gemachte Beobachtung verständlich, daß bei Biotinverarmung von Hefe und *Leuconostoc* die Saccharoseassimilation nicht so stark vermindert ist wie die Glucoseassimilation. Der Energieinhalt der glycosidischen Bindung erlaubt eine phosphorolytische Spaltung zum Glucose-1-Phosphat und macht damit eine Phosphorylierung des Substrats auf Kosten der Energie der Zelle unnötig.

Über die Natur des beobachteten Entkoppelungseffektes bei Biotinmangel lassen sich nur Vermutungen anstellen. Es wäre denkbar, daß durch die Hemmung der biotinbedürftigen Purinsynthese (Moat et al. 1956) ein zu niedriger ADP-Spiegel in der Zelle vorhanden ist. Dies ist aber unwahrscheinlich, da die Energie der offensichtlich biotinunempfindlichen Lichtphosphorylierung auch über das Adenylsäuresystems übertragen werden muß. Wahrscheinlich ist ein direkter Defekt im Koppelungsmechanismus der oxydativen Phosphorylierung. Wie die Umwandlung der Reduktionsenergie in energiereiche Phosphatbindungen in der Atmungskette vor sich geht, ist noch weitgehend ungeklärt. Die fundierteste Theorie dazu vertritt Lehninger (1960). Er nimmt die intermediäre Bildung mehrerer energiereicher Bindungen an unbekannten Substanzen an. Das anorganische Phosphat soll durch phosphorolytische Spaltung einer dieser Bindungen eintreten und letztlich durch Gruppenübertragung auf ADP weitergegeben werden. Wo und wie in einem solchen Mechanismus Biotin eingreifen könnte, ist nicht vorauszusagen. Aus den Studien zur Bildung des  $\text{CO}_2$ -Biotin-Enzym-Komplexes (Lynen et al. 1959) ist jedenfalls die Fähigkeit des Biotinmoleküls zur Teilnahme an Gruppenübertragungsreaktionen bekannt. Besonders die Fähigkeit zur Bildung eines Adenylats läßt auch eine direkte Beteiligung im Koppelungsmechanismus möglich erscheinen.

## V. Zusammenfassung

### Teil A.

1. Nach Vergiften mit Hydroxylamin wurde aus *Chlorella* ein unbekanntes Diphosphat isoliert und als Oxim des Ribulosediphosphats identifiziert.
2. Ribulose zerfällt auf dem Chromatogramm im Laufe der Zeit in 3 Substanzen. Eine davon ist sicher Glyzerinsäure, eine wahrscheinlich Erythrinsäure. Die dritte Substanz konnte nicht identifiziert werden.
3. Die Bildung von cyclischem Glucose-1-2-monophosphat durch Zerfall von Uridindiphosphatglucose unter den Bedingungen der Chromatografie wurde gezeigt. Sein Vorkommen unter den dephosphorylierten Zuckern ist auf die Eigenschaften der "Polydase" zurückzuführen.

### Teil B.

1. Bei Anzucht auf einem komplexen Aminosäurenährboden führt die photosynthetische  $\text{CO}_2$ -Assimilation bei *Ochromonas malhamensis* zu den von anderen Pflanzen bekannten Zwischenprodukten. Daneben erfolgt aber auch über die Carboxylierung von Pyruvat und PEP eine  $\text{CO}_2$ -Fixierung in Höhe von ungefähr 15 - 25 % der Photosynthese.
2. Wird *Ochromonas* auf einem glucosefreien Nährboden herangezogen, so ist die Dunkelfixierung von  $\text{CO}_2$  vermindert und die Photosynthese stark gefördert. Zugabe von Glucose zu glucoseverarmten Zellen kurz vor der Fixierung von  $\text{CO}_2$  erhöht die Dunkelfixierung und führt zu einem Aufstau der durch die Photosynthese gebildeten Hexosen.
3. Bei thiaminverarmten *Ochromonas*zellen ist das osmotische Gleichgewicht gestört.
4. Bei Thiaminmangel ist die Dunkelfixierung von  $\text{CO}_2$  vermindert. Der Anteil von Alanin und Milchsäure an der Radioaktivität fällt stark ab und der Anteil von Glutaminsäure und Zitronensäure nimmt stark zu. Diese Effekte werden aus der Hemmung der oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure erklärt.
5. Die Photosyntheseleistung thiaminverarmter *Ochromonas*zellen ist durch Verminderung der Reduktion von PGS und Hemmung des Pentosecyclus stark herabgesetzt. Ersteres wird auf die beobachtete Rückbildung des Chloroplasten und letzteres auf die Inaktivierung der Transketolase zurückgeführt.

6. Die Dunkelfixierung von  $\text{CO}_2$  ist bei Biotinmangel durch Inaktivierung der PEP-Carboxykinase und/oder der Pyruvatcarboxylase stark vermindert. Die geringe Oxalacetatbildung äußert sich vor allem in einem fast vollständigen Verschwinden des Anteils der radioaktiven Asparaginsäure.
7. Biotin ist als Wirkgruppe eines  $\text{CO}_2$ -aktivierenden Ferments an der Carboxylierung des Ribulosediphosphats in der Photosynthese nicht beteiligt. Die bei Biotinmangel auftretende Vergrößerung der Photosyntheseleistung konnte auf eine Störung im Glucosestoffwechsel zurückgeführt werden.
8. Bei Mangel an Vitamin  $\text{B}_{12}$  tritt in der  $\text{CO}_2$ -Assimilation im Licht und im Dunkeln keine nennenswerte Veränderung auf.
9. Biotinmangel vermindert die Glucoseassimilation im Dunkeln wahrscheinlich durch eine Entkoppelung der Atmungskettenphosphorylierung.

VI. Literaturverzeichnis

- Archibald, A.R., D.J.Manners, J.F.Ryly. 1958. Structure of a reserve polysaccharid from *Ochromonas malhamensis*. Chemistry and Industry (London). 1958, pp.1516-1517.
- Arnon, D.J. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts and polyphenoloxidases in *beta vulgaris*. Plant Phys. 24, pp.1-15.
- Aronoff, S. 1958. Techniques of radiobiochemistry. Iowa State College Press.
- Bandurski, R.S. 1955. Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetat from phosphoenolpyruvat and carbon dioxyde. J.biol.Chem. 217, pp.137-150.
- Barker, H.A., H.Weisbach, R.D.Smyth. 1958. A coenzyme containing pseudo-vitamin B<sub>12</sub>. Proc.Natl.Acad.Sci. 44, pp.1093-1097.
- Bassham, J.A., A.A.Benson, L.D.Kay, A.Z.Harris, A.T.Wilson, M.Calvin. 1954. The path of carbon in photosynthesis. XXI. The cyclic regeneration of carbon dioxyde acceptor. J.Amer.Chem.Soc. 76, pp. 1760-1770.
- Bassham, J.A., M.Calvin. 1957. The path of carbon in photosynthesis. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs N.Y.
- Bassham, J.A., M.Kirk, M.Calvin. 1958. The effects of hydroxylamine on the C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> fixation-pattern during photosynthesis. Proc.Natl.Acad.Sci. 44, pp. 491-493.
- Bassham, J.A., M.Kirk. 1960. Dynamics of the photosynthesis of carbon compounds. I. Carboxylation reactions. Biochem.Biophys.Acta 43, pp.447-464.
- Bernstein, I.A., K.Lentz, M.Malm, P.Schambye, H.G.Wood. 1955. Degradations of glucose-C<sup>14</sup> with *Leuconostoc mesenteroides*, alternative pathways and tracer patterns. J.biol.Chem. 215, pp.137
- Blanchard, M.L., S.Korkes, A.delCampillo, S.Ochoa. 1950. Function of biotin in the metabolism of *Lactobacillus arabinosus*. J.biol.Chem. 187, pp.875-890.
- Calvin, M., J.A.Bassham, A.A.Benson. 1950. Chemical transformations of carbon dioxyde in photosynthesis. Fed.Proc. 9, pp.524-534.
- Calvin, M., N.G.Pon. 1959. Carboxylations and decarboxylations. J.of Cell.and Comp.Phys. 54, pp.51-75.

- Calvin, M., J.A. Bassham. 1960. The path of carbon in photosynthesis. Handbuch der Pflanzenphysiologie. Band V/1. Springer-Verlag.
- Carlson, W.W., V. Whiteside-Carlson. 1949. Biotin-carbohydrate inter-relationship in the metabolism of *Leuconostoc*. *Proc. Soc. f. Exp. Biology* 71, pp. 416-419.
- Cohen, S.S. 1953. Studies on D-ribulose and its enzymatic conversion to D-arabinose. *J. biol. Chem.* 201, pp. 71-83.
- Datta, A.G., E. Racker. 1961. Mechanism of action of transketolase. *J. biol. Chem.* 236, pp. 617-628.
- Dinning, J.S., B.K. Allen, R.S. Young, P.W. Day. 1958. The role of vitamin B<sub>12</sub> in thymine biosynthesis by *Lactobacillus leichmanii*. *J. biol. Chem.* 233, pp. 674-676.
- Feingold, D.S., E.F. Neufeld, W.Z. Hassid. 1958. Synthesis of a B-1-3-linked glucan by extracts of *Phaseolus aureus* seedlings. *J. biol. Chem.* 233, pp. 783-788.
- Fruton, J.S., S. Simmonds. 1959. General Biochemistry. John Wiley & Sons Inc. N.Y.
- Fuller, R.C., I.C. Anderson, H.A. Nathan. 1958.a. Pteridines in photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, pp. 239-244.
- Fuller, R.C., I.C. Anderson, H.A. Nathan. 1958.b. Pteridines in photosynthesis: An artefact of paper chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, pp. 518-519.
- Gibbs, M., O. Kandler. 1957. Asymmetric distribution of C<sup>14</sup> in sugars formed during photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43, pp. 446-451.
- Gilbert, G.A. 1958. A survey of the action of air on aqueous solutions of starch. *Die Stärke* 10, pp. 95-99.
- Glaser, L. 1958. The synthesis of cellulose in cell-free extracts of *Acetobacter xylinum*. *J. biol. Chem.* 232, pp. 627-636.
- Gunsalus, I.C., M. Gibbs. 1952. Position of C<sup>14</sup> in the products of dissimilation by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. biol. Chem.* 194, pp. 871-875.
- Heppel, L.A., R.J. Hilmeo. 1951. Purification and properties of 5'-nucleotidase. *J. biol. Chem.* 188, pp. 665-676.

- Hiatt, H.H., M. Goldstein, J. Lareau, B.L. Horecker. 1958. The pathway of hexose synthesis from pyruvate in muscle. *J. biol. Chem.* 231, pp. 303-307.
- Holm-Hansen, O., N.G. Pon, K. Nishida, V. Moses, M. Calvin. 1959. Uptake and distribution of radioactive carbon from labelled substrates by various cellular compounds of spinach leaves. *Physiologia Plantarum* 12, pp. 475-501.
- Hurwitz, J. 1958. Pentose phosphate cleavage by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochim. et Biophys. Acta* 28, pp. 599-602.
- Hutner, S.H., L. Provasoli, J. Filfus. 1953. Nutrition of some phagotrophic fresh-water chrysomonads. *Ann. New York Acad. of Science* 56, pp. 852-861.
- Jaenicke, L. 1952. Papierelektrophoretische Trennung von Ribosiden als Boratkomplex. *Naturwissenschaften* 39, pp. 86-87.
- Johnson, M.K., C.S. McCleskey. 1958. Further studies on the aerobic metabolism of *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriology* 75, pp. 98-101.
- Kandler, O., M. Gibbs. 1956. Asymmetric distribution of  $C^{14}$  in the glucose phosphate formed during photosynthesis. *Plant Physiology* 31, pp. 411-412.
- Kandler, O. 1957. Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese. IV. Zur Frage einer stöchiometrischen Beziehung zwischen  $CO_2$ -Reduktion und Phosphathaushalt. *Z.f. Naturforschung* 12b, pp. 271-280.
- Kandler, O., M. Gibbs. 1959. Untersuchungen über den Einfluß der Photosynthese auf die Austauschvorgänge innerhalb des Hexosemoleküls. *Z.f. Naturforschung* 14b, pp. 8-13.
- Kandler, O. 1960. Energy transfer through phosphorylation mechanisms in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Phys.* 11, pp. 37-54.
- Kandler, O., Liesenkötter, I., B.A. Oaks. 1961. Die Wirkung von Monojodessigsäure auf Atmung und Photosynthese von *Chlorella*. *Z.f. Naturforschung* 16b, pp. 50-61.
- Karlson, P. 1961. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

- Kasprzyk, Z., M. Calvin. 1959. Search for unstable  $\text{CO}_2$ -fixation products in algae using low temperature liquid scintillators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, pp. 952-959.
- Katsuki, H. 1959. Studies on the metabolic function of biotin. *J. Biochem. (Tokyo)* 46, pp. 612-627 und pp. 979-989.
- Kaufman, S., Ch. Gilvary, O. Cori, S. Ochoa. 1953. Enzymatic oxidation of  $\alpha$ -ketoglutarate and coupled phosphorylation. *J. biol. Chem.* 203, pp. 869-888.
- Kisliuk, R. L. 1961. Further studies on the relationship of vitamin  $\text{B}_{12}$  to methionine synthesis in extracts of *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.* 236, pp. 817-822.
- Korkes, S., A. de Campillo, S. Ochoa. 1952. Pyruvate oxidation system of heart muscle. *J. biol. Chem.* 195, pp. 541-547.
- Lardy, H. L., R. C. Potter, R. H. Burris. 1949. The role of biotin in the bicarbonate utilization by *Lactobacillus arabinosus* studied with  $\text{C}^{14}$ . *J. biol. Chem.* 179, pp. 721-731.
- Leloir, L. F., A. C. Paladini. <sup>1952</sup> Studies on uridine-diphosphat-glucose. *Biochem. J.* 51, pp. 426-430.
- Leloir, L. F., Goldemberg, S. H. 1960. Synthesis of glycogen from uridine-diphosphat-glucose in liver. *J. biol. Chem.* 235, pp. 919-923.
- Leloir, L. F., M. A. R. de Felete, C. E. Cardini. 1961. Starch and oligosaccharide synthesis from uridine-diphosphat-glucose. *J. biol. Chem.* 236, pp. 636-641.
- Lehninger, A. L. 1960. Oxidative phosphorylation in submitochondrial systems. *Fed. Proc.* 19, pp. 952-962.
- Lichstein, H. C. 1957. Bound biotin in oxalacetic carboxylase systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 71, pp. 276-277.
- Linskens, H. F. 1959. *Papierchromatographie in der Botanik*. Springer Verlag.
- Lynen, F., J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting, E. Ringelmann. 1959. Die biochemische Funktion des Biotins. *Angew. Chemie* 71, pp. 481-486.
- Mazelis, M., B. Vennesland. 1957. Carbon dioxide fixation into oxalacetate in higher plants. *Plant Phys.* 32, pp. 591-600.
- Metzner, H., H. Simon, B. Metzner, M. Calvin. 1957. Evidence for an unstable  $\text{CO}_2$ -fixation product in algal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43, pp. 892-895.

- Metzner, H. 1958. Instabile Kohlensäurebindung in Algenzellen.  
Biolog. Zentralblatt 77, pp. 513-554.
- Metzner, H., H. Simon, B. Metzner. 1958. Instabile CO<sub>2</sub>-Fixierung und  
Photosynthese. Z.f. Naturforschung 13b, pp. 366-374.
- Metzner, H., B. Metzner, M. Calvin. 1958. Labile products of early carbon  
dioxide fixation in photosynthesis. Arch. Biochem. Biophys.  
74, pp. 1-6.
- Moat, A. G., Ch. N. Wilkins, H. Friedman. A role for biotin in purine bio-  
synthesis. J. biol. Chem. 985-991.
- Mori, T. 1953. Seaweed polysaccharides. Advances in Carbohydrate Chemistry  
8, New York Academic Press.
- Mortimer, D. C. 1958. Evidence for an alternate pathway in photosynthesis.  
Naturwissenschaften 45, pp. 1-3.
- Moses, V., M. Calvin. 1957. The path of carbon in photosynthesis. XXII.  
The identification of carboxy-keto-pentitol-diphosphates  
as products of photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 43,  
pp. 260-277.
- Moses, M., M. Calvin. 1958. The path of carbon in photosynthesis. XXIII.  
The tentative identification of erythrose phosphate.  
Arch. Biochem. Biophys. 78, pp. 598-600.
- Myers, J., J. R. Graham. 1956. The role of photosynthesis in the physiology  
of Ochromonas. J. Cell. and Comp. Phys. 47, pp. 397-414.
- Ochoa, S., A. H. Mehler, A. Kornberg. 1948. Isolation and properties of an  
enzyme from pigeon liver catalyzing the reversible oxidative  
carboxylation of l-malic acid. J. biol. Chem. 174, pp. 979-1000.
- Pringsheim, E. G. 1952. On the nutrition of Ochromonas. Quat. J. of Micros-  
copic Science 93, pp. 71-96.
- Pringsheim, E. G. 1955. Über Ochromonas danica und andere Arten der Gattung.  
Arch. f. Mikrobiologie 23, pp. 181-192.
- Provasoli, L., I. J. Pintner. 1953. Ecological implications of in vitro  
nutritional requirements of algal flagellates.  
Annals of the N. Y. Acad. of Science 56, pp. 839-851.
- Racker, E. 1957. Phosphoribulokinase and ribulosediphosphat-carboxylase.  
Arch. Biochem. Biophys. 69, pp. 300-310.

- Reazin, G.H. 1954. On the dark metabolism of a golden brown alga *Ochromonas malhamensis*. *Amer.J.of Botany* 41, pp.771-777.
- Reazin, G.H. 1956. The metabolism of glucose by the alga *Ochromonas malhamensis*. *Plant Physiology* 31, pp.299-303.
- Richter, G. 1959. Comparism of enzymes of sugar metabolism in the two photosynthetic algae *Anacystis nidulans* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Naturwissenschaften* 46, pp.604-606.
- Ruben, S., W.Z.Hassid, M.D.Kamen. 1939. Radioactive carbon in the study of photosynthesis. *J.Amer.Chem.Soc.* 61, pp.661-663.
- Simon, H., H.Daniel, J.F.Klebe. 1959. Die Messung von  $C^{14}$  und  $H^3$  in der Gasphase. *Angew.Chemie* 71, pp.303-308.
- Siu, P.M.L., H.G.Wood, R.L.Stjernholm. 1961. Fixation of  $CO_2$  by phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase. *J.biol.Chem.* 236, pp. PC 21 - PC 22.
- Shuster, C.W., F.Lynen. 1960. The role of Cofactors and enzyme-bound biotin in the  $CO_2$ -Pyruvat exchange reactions. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2, pp.350-355.
- Stadtman, E.R., P.Overath, H.Eggerer, F.Lynen. 1960. The role of biotin and  $B_{12}$  coenzyme in propionate metabolism. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 2, pp. 1-7.
- Stjernholm, R.L., H.G.Wood. 1961. Methylmalonyl-isomerase. II: purification and properties of the enzyme from propionibacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 47, pp.303-313.
- Stone, B.A. 1957. Complexity of D-glucanases in *Aspergillus niger*. *Biochem.J.* 66, p. 1 P.
- Strasburger, E. 1958. *Lehrbuch der Botanik*. 27.Auflage. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Strauss, R.R., Moat A.G. 1958. A role for biotin in yeast glycolysis. *J.biol.Chem.* 233, pp.765-769.
- Takeyama, S., F.F.Hatch, J.M.Buchanan. 1961. Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine. II: involvement of vitamin  $B_{12}$ . *J.biol.Chem.* 236, pp.1102-1108.
- Tchen, T.T., Vennesland, B. 1955. Enzymatic carbon dioxide fixation into oxalacetate in wheat germ. *J.biol.Chem.* 213, pp.533-546.

- Trevelyan, W.E., D.P. Procter, J.S. Harrison. 1950. Detection of sugars on chromatograms.. *Nature* (London) 166, pp. 444-445.
- Utter, M.F., Kurahashi, K. 1954. Mechanism of action of oxalacetic carboxylase. *J. biol. Chem.* 207, pp. 221-241.
- Utter, M.F., D.B. Keech. 1960. Formation of oxalacetate from pyruvate and CO<sub>2</sub>. *J. biol. Chem.* 235, pp. PC 17 - 18.
- Varma, T.N.R., K.S. Srinivasan. 1954/56. Enzyme systems in *Aspergillus flavus*. I. Phosphomonoesterases and inorganic pyrophosphatases. *Enzymologia* 17, pp. 116-122.
- Vennesland, B., Conn, E.E. 1952. Carboxylating enzymes in plants. *Ann. Rev. Plant Physiology* 3, pp. 307-332.
- Wiesenberger, E. 1948. *Mikrochemie* 33, p. 51.
- Williams, V.R., E.A. Andrews, J.F. Christman. 1957. Studies on a biotin-hexokinase interrelationship. *Arch. Biochem. Biophys.* 66, pp. 234-240.
- Wohl, A. 1893. Abbau des Traubenzuckers. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 26, pp. 730-744.
- Wolfe, R.S., D.J. O'Kane. 1955. Cofactors of the carbon dioxide exchange reaction of *Clostridium butyricum*. *J. biol. Chem.* 215, pp. 637-643.
- Wood, H.G., R.L. Stjernholm. 1961. Transcarboxylase. II: purification and properties of methylmalonyl-oxalacetic transcarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47, pp. 289-303.
- Woronick, C.L., M.J. Johnson. 1960. Carbon dioxide fixation by cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *J. biol. Chem.* 235, pp. 9-15.

Die vorliegende Arbeit wurde im Bakteriologischen Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weihenstephan angefertigt. Herr Prof. Dr. O. Kandler vom Institut für Angewandte Botanik der Technischen Hochschule München überließ mir freundlicherweise das Thema und förderte den Fortgang der Arbeit außerordentlich durch seine ständige rege Anteilnahme und durch viele fruchtbare Ratschläge. Dafür möchte ich ihm auch an dieser Stelle meinen wärmsten Dank aussprechen. Dank gebührt weiterhin der Deutschen Forschungsgemeinschaft für persönliche und sachliche finanzielle Unterstützung sowie Herrn Dozent Dr. H. Simon vom Org.-chem. Institut der TH München für seine Anleitung in der Isotopenzähltechnik und für Gaben seltener Substanzen. Frau E. Hammermeyer-Woller und Frl. H. Baldauf danke ich für ihre verständnisvolle Mithilfe bei den Versuchen.

**Lebenslauf.**

=====

Geboren wurde ich, Heinz Kauß, am 1.3.1935 in Bad Dürkheim (Rheinpfalz) als Sohn des Winzers und Weinkommissionärs Fritz Karl Kauß und seiner Ehefrau Katharina geb. Weihl. Von 1941-1945 besuchte ich die Volksschule in Ungstein bei Bad Dürkheim, von 1945-1951 das 6-klassige naturwissenschaftliche Gymnasium in Bad Dürkheim und von 1951-1954 das naturwissenschaftliche Gymnasium an der Jägerstraße in Ludwigshafen/Rhein. Dort legte ich im März 1954 das Abitur ab. Nach halbjährigem technologischem Praktikum in der BASF in Ludwigshafen und einsemestrigem Technik-Studium an der TH Karlsruhe begann ich 1955 an der Universität Heidelberg mit dem Biologiestudium. Seit dem Wintersemester 1955/56 studierte ich an der Universität München und arbeitete seit dem Herbst 1958 im Bakteriologischen Institut Weihenstephan an der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. O. Kandler. Seit 2 Jahren habe ich eine Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft inne.

Verfahren

Die vorstehende Darstellung ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen, die im Rahmen des Projekts "Zur Entwicklung der deutschen Wirtschaft im Zweiten Weltkrieg" durchgeführt wurden. Die Untersuchungen wurden in drei Phasen unterteilt: 1. Die Phase der Vorbereitung, 2. Die Phase der Durchführung und 3. Die Phase der Auswertung. In der ersten Phase wurde die Aufgabenstellung des Projekts festgelegt und die notwendigen Vorarbeiten geleistet. In der zweiten Phase wurden die Untersuchungen durchgeführt und die Ergebnisse dokumentiert. In der dritten Phase wurde die Auswertung der Ergebnisse vorgenommen und die Schlussfolgerungen gezogen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die deutsche Wirtschaft im Zweiten Weltkrieg eine erhebliche Entwicklung erfuhr. Die Produktion wurde gesteigert und die Wirtschaft wurde modernisiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

| Phase           | Ergebnisse                                                    |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| 1. Vorbereitung | Festlegung der Aufgabenstellung, Vorarbeiten                  |
| 2. Durchführung | Durchführung der Untersuchungen, Dokumentation der Ergebnisse |
| 3. Auswertung   | Auswertung der Ergebnisse, Ziehung von Schlussfolgerungen     |

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die deutsche Wirtschaft im Zweiten Weltkrieg eine erhebliche Entwicklung erfuhr. Die Produktion wurde gesteigert und die Wirtschaft wurde modernisiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Die vorstehende Darstellung ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen, die im Rahmen des Projekts "Zur Entwicklung der deutschen Wirtschaft im Zweiten Weltkrieg" durchgeführt wurden. Die Untersuchungen wurden in drei Phasen unterteilt: 1. Die Phase der Vorbereitung, 2. Die Phase der Durchführung und 3. Die Phase der Auswertung. In der ersten Phase wurde die Aufgabenstellung des Projekts festgelegt und die notwendigen Vorarbeiten geleistet. In der zweiten Phase wurden die Untersuchungen durchgeführt und die Ergebnisse dokumentiert. In der dritten Phase wurde die Auswertung der Ergebnisse vorgenommen und die Schlussfolgerungen gezogen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die deutsche Wirtschaft im Zweiten Weltkrieg eine erhebliche Entwicklung erfuhr. Die Produktion wurde gesteigert und die Wirtschaft wurde modernisiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:



